

**DIE CHROMOSOMALE ORGANISATION DER
MERODIPLOIDIE BEI RHIZOBIUM LUPINI**

von
Reiner Springer
aus

Fürth / Bay.

1977 № 137



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41548420_0016

DIE CHROMOSOMALE ORGANISATION DER MERODIPLOIDIE BEI RHIZOBIUM LUPINI

Den Naturwissenschaftlichen Fachbereichen
der Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg
zur
Erlangung des Doktorgrades

vorgelegt
von
Reiner Springer
aus
Fürth / Bay.

Als Dissertation genehmigt
von den Naturwissenschaftlichen Fachbereichen
der Universität Erlangen-Nürnberg

Tag der mündlichen Prüfung: 9. Febr. 1977

Vorsitzender der Promotionskommission:	Prof. Dr. E. Schweizer
Erstberichterstatte:	Prof. Dr. W. Heumann
Zweitberichterstatte:	Priv.-Doz. Dr. A. Pühler

Inhalt	Seite
I. <u>Zusammenfassung</u>	1
II. <u>Einleitung</u>	3
III. <u>Materialien und Methoden</u>	5
1. Bakterienstämme	5
2. Abkürzungen	6
3. Medien und Puffer	7
4. Chemikalien	8
5. Genetische Methoden	9
6. Minizellenpräparation	12
7. Molekularbiologische Methoden	14
IV. <u>Ergebnisse</u>	16
1. <u>Molekularbiologische Experimente</u>	16
1.1. DNA-Dichtebestimmung von 1-171, 1-716 und 171-716	16
1.2. CsCl-EtBr-Dichtegradientenzentrifugation diploider Stämme	17
1.3. DNA-Untersuchung an Minizellen diploider Stämme	19
1.3.1. Anwendbarkeit von Minizellen zur Struk- turaufklärung merodiploider Stämme	19
1.3.2. Bildung diploider Minizellenproduzenten	19
1.3.3. Vergleichende DNA-Untersuchung von Mini- zellen haploider und diploider Stämme	21
1.3.4. Funktionsfähigkeit der Minizellen von 171-536	26

2.	<u>Genetische Experimente</u>	30
2.1.	Darstellung des Versuchsablaufs	30
2.2.	Der diploide Stamm <u>44-716</u>	32
2.2.1.	Entstehung und Eigenschaften	32
2.2.2.	Segregantenanalyse	33
2.2.3.	Auxotrophe Mutanten	34
2.2.4.	Kreuzungen mit Rezipienten	35
2.2.4.1.	Aufspaltung der diploiden Donoren	36
2.2.4.2.	Ergebnisse der Kreuzungen	38
2.2.4.3.	Zusammenfassung der Ergebnisse	44
2.3.	Der diploide Stamm <u>171-43</u>	45
2.3.1.	Entstehung und Eigenschaften	45
2.3.2.	Segregantenanalyse	45
2.3.3.	Auxotrophe Mutanten	46
2.3.4.	Kreuzungen mit Rezipienten	47
2.3.4.1.	Aufspaltung des diploiden Donors	47
2.3.4.2.	Ergebnisse der Kreuzungen	48
2.3.4.3.	Zusammenfassung der Ergebnisse	50
2.3.5.	Kreuzungen mit den Elternstämmen von 171-43	50
2.4.	Der diploide Stamm <u>44-690</u>	52
2.4.1.	Entstehung und Eigenschaften	52
2.4.2.	Segregantenanalyse	52
2.4.3.	Auxotrophe Mutanten	54
2.4.4.	Kreuzungen mit Rezipienten	56
2.4.4.1.	Aufspaltung der diploiden Donoren	56
2.4.4.2.	Ergebnisse der Kreuzungen	57

	Seite
2.4.4.3. Zusammenfassung der Ergebnisse	59
2.4.5. Kreuzungen mit den Elternstämmen von 44-690	59
V. <u>Diskussion</u>	61
1. Allgemeines	61
2. Molekularbiologische Experimente	62
2.1. DNA-Dichtebestimmungen	62
2.2. CsCl-EtBr-Dichtegradientenzentrifugation der DNA haploider und diploider Stämme	63
2.3. Untersuchungen an Minizellen diploider Stämme	64
3. Genetische Experimente	66
3.1. Entstehung der diploiden Genomstruktur	66
3.2. Aufhebung des diploiden Zustandes	76
3.3. Kreuzungsexperimente	80
3.3.1. Kreuzungen mit 44-716	81
3.3.2. Kreuzungen mit 171-43	85
3.3.3. Kreuzungen mit 44-690	86
3.3.4. Kreuzungen mit Eltern diploider Stämme	86
4. Bedeutung von Insertionssequenzen für die Merodiploidie	88
5. Verbreitung der Diploidie	90
VI. <u>Literatur</u>	92

I. Z u s a m m e n f a s s u n g

Merodiploide Kolonien von Rhizobium lupini entstehen, wenn ein während der Konjugation auf die Rezipientenzelle übertragenes Genomstück des Donors in den Nachkommen der Merozygote erhalten bleibt. Dies könnte entweder durch Zirkularisierung des Exogenoten unter Bildung eines selbständigen Replikons oder durch Insertion des Exogenoten in das Rezipientenchromosom erfolgen.

Mit molekularbiologischen und genetischen Experimenten wurde diese Alternative zu entscheiden versucht.

Die Untersuchung der DNA merodiploider und haploider Stämme durch CsCl-EtBr-Dichtegradientenzentrifugation ergab stets nur eine chromosomale Bande. Eine vom Exogenoten stammende Plasmidbande wurde bei keinem der merodiploiden Stämme beobachtet.

Minizellenproduzierende Mutanten diploider Stämme wurden daraufhin untersucht, ob der Exogenot als selbständiges, extrachromosomales Element in die Minizellen segregieren kann. Die Versuche zeigten, daß in den Minizellen merodiploider Stämme keine DNA nachweisbar war, während die Minizellen eines diploiden, mit dem RP4-Plasmid infizierten Stammes Plasmid-DNA enthielten.

Kreuzungsexperimente mit auxotrophen Mutanten diploider Donoren und verschiedenen, haploiden Rezipienten führten

zur Entstehung diploider Rekombinanten mit Farbe und Segregationsverhalten des jeweiligen Donors. Dieser Simultantransfer von Endo- und Exogenot des Donors zeigte die Insertion des Exogenoten bei der Stabilisierung der Diploidie unter Ausbildung einer Tandemstruktur. Umfangreiche Segregantenanalysen diploider Stämme ermöglichten den Versuch, die Reihenfolge der markierten Genorte der Elternstämme in der diploiden Region festzulegen.

II. E i n l e i t u n g

Bei der Kreuzung unterschiedlich pigmentierter Stämme von Rhizobium lupini werden Rekombinanten mit der Farbe des einen oder anderen Elternstammes gebildet, deren Anteil durch die Lage der Auxotrophiemarkierungen der Kreuzungspartner relativ zur Karotinoidregion bestimmt wird (10). Diese haploiden Rekombinanten entstehen durch einen sofortigen Austausch homologer DNA-Bereiche des Rezipientenchromosoms (Endogenot) gegen die vom Donor übertragene DNA (Exogenot). Daneben werden bis zu zehn Prozent prototrophe, in die beiden Elternfarben sektorierte Kolonien beobachtet, die durch unterschiedliche Rekombinationsereignisse in den ersten Nachkommen der partiell diploiden Zygote hervorgehen. Bei vielen Kreuzungen kommt es auch zur Entstehung stabiler, merodiploider Zygoten. Die von ihnen gebildeten Kolonien können an der Additionsfarbe der Karotinoidinformation bei der Eltern erkannt werden. Braune Merodiploide entstehen aus Kreuzungen von Weiß bzw. Rosa x Gelb, gelbe Merodiploide aus Rosa x Weiß und Weiß x Weiß. Der Anteil merodiploider Kolonien kann bis zu fünf Prozent betragen, liegt aber meist unter einem Prozent der Gesamtzahl der Rekombinanten. Die Merodiploiden bilden auf Vollmedium wieder haploide Segreganten, die alle Kombinationen der elterlichen Farben und Auxotrophiemarkierungen tragen oder prototroph sind. Prototrophie und Pigmentierung

diploider Stämme sind also die Folge einer Komplementation zwischen Exo- und Endogenoten; der Entstehung haploider Segreganten geht ein Rekombinationsereignis zwischen den diploiden Regionen voraus (11). Um die Eigenschaft der Diploidie über viele Generationen bewahren zu können, muß der Exogenot in der merodiploiden Zelle stabilisiert und synchron mit dem Endogenoten repliziert werden. Zwei Alternativen bieten sich an: Der Exogenot kann entweder als selbständiges Replikon plasmidähnlich in der Zelle vorliegen oder inseriert in das Chromosom eine Tandemstruktur bilden. Ziel dieser Arbeit ist es, diese Frage nach der Zytologie der merodiploiden Transkonjuganten zu klären. Zur Plasmidhypothese wurden molekularbiologische, zur Insertionshypothese genetische Methoden angewandt.

III. M a t e r i a l i e n u n d M e t h o d e n

1. Bakterienstämme

Stamm	Genetische Markierungen	Fertilität
1-43	thi A car y	Fc ⁺ Fd ⁺
1-44	thi A car l	Fc ⁺ Fd ⁺
1-171	cys O car p	Fc ⁺ Fd ⁺
1-690	ade G car l	Fc ⁺ Fd ⁺
1-574	pro A car l	Fc ⁺ Fd ⁻
1-388	thr A car l	Fc ⁻ Fd ⁺
1-536	his C car y Mz	Fc ⁻ Fd ⁺
1-590	thi A car l	Fc ⁻ Fc ⁻
1-593	ade B car l	Fc ⁻ Fd ⁻
1-711	ade F car citr	Fc ⁻ Fd ⁻
1-716	cys E car y	Fc ⁻ Fd ⁻
1-921	cys O car p	Fc ⁻ Fd ⁻

Tabelle 1a: Haploide Mutanten von Rhizobium lupini

Stamm	Markierung	Farbe	Entstehung
171-716	prt	braun	1-171 x 1-716
171-712	prt	braun	1-171 x 1-712
44-716	prt	braun	1-44 x 1-716
171-536	prt	braun	1-171 x 1-536
171-43	prt	braun	1-171 x 1-43
44-690	prt	gelb	1-44 x 1-690

Tabelle 1b: Diploide Stämme von Rhizobium lupini

2. Abkürzungen

prt	Prototrophie	
cys	Auxotrophie für Cystin	
his	"	" Histidin
thr	"	" Threonin
gly	"	" Glycin
arg	"	" Arginin
pro	"	" Prolin
ade	"	" Adenin
thi	"	" Thiamin
fil	Filamentbildung	
Mz	Minizellenbildung	
F	Fertilität	+ = vorhanden - = nicht vorhanden
Fc	Fertilität für die c'-Region	
Fd	Fertilität für die d-Region	

car y	gelb
car p	rosa
car l	weiß
car citr	zitronengelb
car ly	hellgelb
car br	braun

3. Medien und Puffer

NB : Nutrient Broth (Difco), Vollmedium

MM : Minimalmedium

MM + NB : Minimalmedium mit 1% NB

Zusätze:

Cys	50 µg/ml
Ade	10 µg/ml
Thi	10 µg/ml

Für Festmedium wurden 15 g Agar (Oxoid) pro Liter
Flüssigmedium zugesetzt.

Puffer:

Azetatpuffer: für Nitritmutagenese

6,25 ml Eisessig

43,00 ml 1n NaOH

auf 250 ml auffüllen pH = 4,3

TES-Puffer: nach Bazaral (1968)
für DNA-Isolierung

Tris	0,05 M	
EDTA	0,005 M	pH = 8
NaCl	0,05 M	

Für Verdünnungsreihen wurde destilliertes Wasser verwendet.

4. Chemikalien

Saccharose (Sucrose), Caesiumchlorid (CsCl), Eisessig, Äthylendiaminotetraessigsäure (EDTA), Tris-hydroxymethyl-amino-methan (Tris), Natriumhydroxid, Natriumchlorid: Merck, Darmstadt

Ribonuklease (RNase), Äthidiumbromid (EtBr): Serva, Heidelberg

Sarkosyl NL 30: Geigy, Basel

Lysozym: Böhringer, Mannheim

Natriumnitrit: Riedel-De Haën, Hannover

Penicillin: Hoechst, Frankfurt

5. Genetische Methoden

5.1. Anzucht der Bakterien

Die Bakterien wurden in flüssigem NB-Medium über Nacht bei 30°C unter Belüftung angezogen. Die Ausgangsdichte der Bakteriensuspension wurde so gewählt, daß sich die Zellen am nächsten Morgen noch in der logarithmischen Phase befanden. Prototrophe, diploide Stämme wurden in flüssigem Minimalmedium angezogen, um das Wachstum sich bildender, auxotropher Segreganten zu verhindern.

5.2. Ernte der Zellen

Sie erfolgte durch Zentrifugation der Bakteriensuspensionen bei 8000 Upm für 15 Minuten. Sollten die Zellen auch gewaschen werden, so wurde das Zentrifugat in Wasser aufgenommen und nochmals abzentrifugiert.

5.3. Ermittlung des Lebendtiters

Der Lebendtiter der Zellen wurde durch Ausspateln einer Verdünnungsreihe auf NB-Platten und Zählen der entstandenen Kolonien ermittelt.

5.4. Vollkreuzung

Je 0,05 ml der abzentrifugierten Übernachtskulturen der Kreuzungspartner wurden in 1 ml Wasser gemischt. Vom Zentrifugat der Mischung bzw. dessen Verdünnungen wurden jeweils 0,01 ml auf MM+NB-Platten ausgespatelt. Nach 10 Tagen Bebrütung bei 30°C wurden die Rekombinanten gezählt. Zur Kontrolle der Stabilität der auxotrophen Markierungen der an der Kreuzung beteiligten Stämme wurden die unge-

mischten Zentrifugate bei gleicher Verdünnungsstufe auf MM+NB-Platten ausgespatelt.

Bezeichnung der Verdünnungsstufen:

Verdünnungsstufe I : 0,01 ml vom Zentrifugat
Verdünnungsstufe II : 0,01 ml einer 1:10 Verdünnung
Verdünnungsstufe III : 0,01 ml einer 1:100 Verdünnung
usw. pro MM+NB-Platte ausgespatelt

Berechnung der Rekombinationsrate einer Kreuzung:

$$\text{Rekombinationsrate} = \frac{\text{Zahl der Rekombinanten pro Platte}}{\text{Zahl der Donorzellen pro Platte}}$$

Die Zahl der an einer Kreuzung beteiligten Zellen wurde durch eine Verdünnungsreihe des Zentrifugats der Mischung auf NB-Platten ermittelt. Dies wurde nur für einige Kreuzungen durchgeführt und daraus ein Mittelwert berechnet, der für alle anderen Kreuzungen zur Berechnung der Rekombinationsrate verwendet wurde. Da die Zahl der Donoren nur der Hälfte der Zellzahl entsprach, wurde der Mittelwert halbiert. Es sind bei

Verdünnungsstufe I : 3×10^9 Donoren/Platte

Verdünnungsstufe II : 3×10^8 Donoren/Platte

5.5. Schnellkreuzung

Zur Ermittlung von Donoreigenschaften und Identifizierung von Genmarkierungen wurden Schnellkreuzungen durch Querstreichen von Bakteriensuspensionen auf MM+NB-Platten durchgeführt.

5.6. Nitritmutagenese

Die Übernachtskultur des zu mutierenden Stammes wurde mit 10 ml Wasser gewaschen und das Zentrifugat in 3 ml Wasser 4 bis 5 Stunden bei 30°C im Wasserbad ausgehungert. Anschließend wurden 3 ml Azetatpuffer und 3 ml Natriumnitritlösung (Endkonzentration 1,15 mg/ml = 0,017 molar) hinzupipettiert. Nach einer Einwirkungszeit von 18 - 24 Minuten wurden die Zellen gewaschen und das Zentrifugat je nach Ziel der Mutagenese unterschiedlich weiter behandelt:

Für die Gewinnung von Auxotrophiemutanten wurden die Zellen in 10 ml Minimalmedium mit Penicillin (273 E/ml) für 6 Stunden kultiviert. Prototrophe, vermehrungsfähige Zellen wurden größtenteils vom Penicillin abgetötet, die auxotrophen Mutanten überlebten. Nach einem Waschschrift wurden die noch lebenden Zellen über Nacht in flüssigem Vollmedium angezogen. Danach wurde eine Verdünnungsreihe auf NB-Platten ausgespatelt, nach 5 - 6 Tagen die entstandenen Kolonien auf MM-Platten unter Zugabe von Supplementen (Aminosäuren, Vitamine, Nukleinsäurebasen) getestet, ob und wofür sie auxotroph geworden waren.

Für die Gewinnung von Mutanten mit nicht selektiven Markierungen (Minizellenbildung) wurde nach der Nitritbehandlung sofort eine Verdünnungsreihe auf NB-Platten angelegt und die gewünschten Mutanten aufgrund abweichender Morphologie der von ihnen gebildeten Kolonien selektioniert.

5.7. Segregantenisolierung

Für die Untersuchung haploider Segreganten wurden die merodiploiden Kolonien, während deren Wachstum es - erkennbar an der Sektorbildung - zur Segregation gekommen war, zu Einzelzellen ausgestrichen oder ausgespatelt. Die merodiploiden Zellen bildeten wieder sektorierte Kolonien, die Segregantenzellen aus den Sektoren haploide Kolonien, die nun leicht isoliert werden konnten.

5.8. Übertragung des RP4-Plasmids

Logarithmisch wachsende Kulturen eines weißen RP4-Donorstammes (1-20) und eines andersfarbigen Rezipienten wurden zu gleichen Teilen gemischt, 0,1 ml davon auf NB-Agar ausgespatelt und 24 Stunden bei 30°C bebrütet. Der entstandene Bakterienrasen wurde in Wasser resuspendiert und eine Verdünnungsreihe auf NB-Platten mit Tetracyclin angelegt. Nach 5 Tagen wurden resistente Kolonien mit der Farbe des Rezipienten isoliert und mit der Stempeltechnik auf die 3 vom RP4-Plasmid vermittelten Resistenzen gegen Ampicillin, Kanamycin und Tetracyclin getestet.

6. Minizellenpräparation

6.1. Anzucht

Die Anzucht der Bakterien für die Minizellenpräparation erfolgte auf Festmedium (12 MM- bzw. NB-Platten). Jeweils 0,3 ml einer Übernachtskultur des minizellenproduzierenden Stammes wurden pro Platte ausgespatelt und 3 Tage bebrütet, um eine dichten Rasen zu erhalten, da die Minizellen-

produktion bevorzugt in der Stationärphase stattfindet.

6.2. Differentielle Zentrifugation

Eine von den angezogenen Bakterien hergestellte 900 ml Suspension in Wasser wurde bei 2000 g für 15 Minuten zentrifugiert. Bei dieser differentiellen Zentrifugation blieben die Minizellen größtenteils im Überstand, während die übrigen Zellen überwiegend sedimentierten. Der Überstand mit den grobgereinigten Minizellen wurde bei 12000 g 15 Minuten lang abzentrifugiert und gewaschen.

6.3. Sucrosegradiententechnik

Die grobgereinigten Minizellen wurden anschließend auf einen linearen 15 ml Sucrosegradienten 5 - 20 % (Gewichtsprozent) aufgetragen (max. 0,6 ml Suspension pro Gradient) und 30 Minuten bei 4000 g im Ausschwingrotor zentrifugiert. Die in der oberen Hälfte des Gradienten entstandene Minizellenbande wurde abgenommen, sedimentiert und nochmals im Sucrosegradienten gereinigt. Die gewonnenen Minizellenfraktionen wurden mit Wasser auf das einheitliche Volumen von 1 ml gebracht. Davon wurde eine Verdünnungsreihe auf Vollmedium zur Errechnung des Titors noch vorhandener, teilungsfähiger Zellen angelegt und mit der Zählkammer die Gesamtzahl der Minizellen und teilungsfähigen Zellen ermittelt. Abschließend wurden die Minizellenfraktionen zweimal in TES-Puffer gewaschen.

Alle Zentrifugationen zur Minizellenisolierung wurden in einer Sorvall Kühlzentrifuge Superspeed RC2-B durchgeführt.

7. Molekularbiologische Experimente

7.1. Lyse der Zellen

Eine 10 ml Kultur oder Minizellensuspension wurde abzentrifugiert und zweimal in TES-Puffer gewaschen. Anschließend wurden die Zellen in 0,25 ml Sucrose (20% in TES) resuspendiert. Nach Zugabe von 0,25 ml Lysozym RNase-Lösung (6 mg Lysozym/ml, 2 mg RNase/ml, 20 % Sucrose in TES) wurde das Gemisch 20 Minuten bei 37°C inkubiert, mit 0,1 ml Sarkosyl NL 30 (10 %ige Lösung in 0,25 M EDTA) versetzt und bis zum Aufklaren in der Hand gedreht.

7.2. Analytische Ultrazentrifugation

Die CsCl-Dichtegradientenzentrifugation in der analytischen Ultrazentrifuge wurde zur Ermittlung des DNA-Gehalts in Minizellen und zur Dichtebestimmung von DNA verwendet. 0,15 bis 0,3 ml der Lysate und 0,55 g CsCl wurden in TES-Puffer gemischt, die CsCl-Eingangsdichte betrug 1,725 g/ml. Der Gradient (0,4 ml) wurde 27 Stunden mit 44000 Upm in Doppelsektorzellen eines An-F-Ti Rotors in der analytischen Ultrazentrifuge (Model E, Beckman) zentrifugiert. Die DNA-Banden wurden durch UV-Absorption bei 262 nm identifiziert und mit einem photoelektrischen Scanner mit 10" Recorder registriert.

Durch Zugabe einer Referenz-DNA (E.coli NC22, $\rho = 1,710$ g/ml) und Berechnung nach der Formel von Ifft

$$\rho = \rho_{\text{Ref.}} + \frac{w^2}{2\beta} (x^2 - x_{\text{Ref.}}^2)$$
 konnten die DNA-Dichten bestimmt werden.

ρ = Dichte der Probe, ρ_{Ref} = Dichte der Referenz-DNA

w = Winkelgeschwindigkeit

β = Konstante = $1,19 \times 10^9$

x, x_{Ref} : Abstand der Probenbande (x) bzw. der Referenzbande (x_{Ref}) vom Rotationszentrum..

7.3. Präparative CsCl-EtBr-Dichtegradientenzentrifugation

1,8 ml des Lysats einer 30 ml Kultur, das mit 0,15 ml EtBr versetzt worden war, wurde in einem Zentrifugenröhrchen mit TES-Puffer auf 5 ml aufgefüllt und 4,9 g CsCl darin gelöst (Eingangsdichte 1,6 g/ml). Die Zentrifugation der Mischung erfolgte in der Beckman-Ultrazentrifuge L2-65B im Festwinkelrotor 75 Ti bei 35000 Upm und 25°C über 48 Stunden. Die DNA-Banden wurden durch Bestrahlen mit UV-Licht sichtbar gemacht.

IV. E r g e b n i s s e

1. Molekularbiologische Experimente

1.1. DNA-Dichtebestimmung von 1-171, 1-716 und 171-716

1.1.1. Ziel der Untersuchung

Der merodiploide Stamm 171-716 war aus der Kreuzung von 1-171 mit 1-716 hervorgegangen (11). Da die beiden Stämme verschiedene Herkunft hatten, sollte geprüft werden, ob sich die Dichten ihrer DNA unterscheiden. Dies wäre für die molekularbiologischen Untersuchungen von 171-716 vorteilhaft gewesen, da die DNA des Endogenoten (1-716) im CsCl-Gradienten dann an anderer Stelle bandieren würde als die DNA des Exogenoten (1-171) (34). Aus dem Größenverhältnis der Banden würde sich der Anteil der Exogenoten-DNA in den diploiden Zellen ermitteln lassen. Eine Aussage über den Zustand des Exogenoten - integriert oder extrachromosomal - wäre erst nach Abnahme der Exogenotenbande und ihrer Untersuchung im Elektronenmikroskop möglich, aber nur dann, wenn dieser als Plasmid in einer Größe vorliegt, die seine Isolierung als intaktes, zirkuläres Molekül nicht verhindert.

1.1.2. DNA-Dichtebestimmung

Die DNA von 1-171, 1-716 und 171-716 wurde nach der Sarkosylmethode isoliert und das Lysat durch eine CsCl-Dichtegradientenzentrifugation in der analytischen UZ untersucht. Als Dichtemarkierung diente die chromosomale DNA aus E.coli NC22 mit der Dichte 1,710 g/ml. Mit diesem

Dichtestandard und der Lage der Banden der drei untersuchten Stämme wurden nach der Formel von Ifft (s. Kap. III.7.2. S. 14) die DNA-Dichten ermittelt.

Sie betragen für

1-171	1,7250 g/ml
1-716	1,7247 g/ml
171-716	1,7248 g/ml

Ergebnis:

- Die beiden Elternstämme 1-171 und 1-716 haben übereinstimmende DNA-Dichten.
- Der diploide Stamm 171-716 zeigt daher im CsCl-Gradienten nur eine Bande mit der gleichen Dichte.

1.2. CsCl-Dichtegradientenzentrifugation diploider Stämme

1.2.1. Theoretische Grundlagen

Ein Exogenot, der in der merodiploiden Zelle als Plasmid vorliegt, könnte wegen seiner mit der Endogenoten-DNA übereinstimmenden Dichte im CsCl-Gradienten nicht nachgewiesen werden (s. Kap. IV.1.1.2.). Auch der Dichteunterschied, der sich aus der unterschiedlichen Struktur des Endogenoten als lineare (= chromosomale DNA) und des Exogenoten als ccc-DNA ergeben würde, wäre für eine getrennte Bandierung zu gering. Die Trennung dieser DNA-Formen wird jedoch durch die Zugabe von Äthidiumbromid möglich, da ccc-DNA weniger Äthidiumbromid als lineare DNA einbaut und daher eine geringere Dichteerniedrigung erfährt. Ein Exogenot in ccc-Form müßte also im CsCl-EtBr-Dichtegradienten unterhalb der chromosomalen Bande eine Plasmidbande bilden.

1.2.2. CsCl-EtBr-Dichtegradientenzentrifugation

Für die CsCl-EtBr-Dichtegradientenzentrifugation wurden folgende Stämme verwendet:

- a) diploide Stämme: 171-716, 171-712, 44-716, 171-536
- b) haploide Stämme: 1-171, 1-716, 1-44
- c) als Kontrolle: 1-716(RP4)

Eine 30 ml Kultur von jedem Stamm wurde nach der Sarkosyl-methode lysiert (s. Kap. III.7.1., jedoch 3-fache Menge) und das Lysat einer CsCl-EtBr-Dichtegradientenzentrifugation unterzogen. Die Banden wurden durch ihre Fluoreszenz im UV-Licht sichtbar gemacht.

1.2.3. Ergebnis

Alle haploiden und diploiden Stämme bildeten nur eine Bande mit chromosomaler DNA aus. Bei keinem der diploiden Stämme konnte eine zusätzliche DNA-Bande beobachtet werden, nur bei 1-716(RP4) befand sich erwartungsgemäß unterhalb der chromosomalen DNA eine schwächer ausgebildete Plasmidbande mit der DNA des RP4-Plasmids.

Der Exogenot ließ sich also nicht als zirkuläres Molekül nachweisen. Dies schließt jedoch seine Existenz in dieser Form dann nicht aus, wenn er so lang ist, daß seine zirkuläre Struktur während der Isolierung zerstört wird und die entstehenden linearen Stücke in der chromosomalen Bande verschwinden.

1.3. DNA-Untersuchung an Minizellen diploider Stämme

1.3.1. Anwendbarkeit von Minizellen zur Strukturaufklärung merodiploider Rhizobien

Bei Rhizobium lupini (32), Escherichia coli und Bacillus subtilis (7) sind Mutanten bekannt, die aufgrund gestörter Zellteilung Minizellen produzieren. Minizellen besitzen kein Chromosom, können aber extrachromosomale DNA-Elemente, z.B. R- und Col-Plasmide von den Elternzellen aufnehmen. Durch Abtrennung der Minizellen von den normalen Zellen steht eine Methode zur Verfügung, um extrachromosomale DNA anzureichern und den Anteil chromosomaler DNA bis auf einen minimalen Rest zu verringern. Die folgenden Versuche sollten das Strukturproblem der merodiploiden Stämme durch die Anwendung diploider Minizellenbildner lösen helfen. Enthalten die Minizellen diploider Stämme DNA, nicht aber die Minizellen ihrer haploiden Eltern oder Segreganten, so ist dies ein Beweis für den Plasmidcharakter des Exogenoten. Sind die Minizellen diploider Stämme dagegen frei von DNA, so kann dies als Hinweis auf eine Integration angesehen werden.

1.3.2. Bildung merodiploider Minizellenproduzenten

Für die Herstellung merodiploider Minizellenproduzenten gab es 2 Möglichkeiten:

- a) Die direkte Umwandlung merodiploider Stämme in Minizellenbildner durch Nitritmutagenese. Sie war erfolglos.
- b) Gelbe Rezipientenstämme werden durch Nitritmutagenese in Minizellenbildner verwandelt, anschließend mit einem

rosa Donor gekreuzt und unter den gelben und rosa Rekombinanten nach braunen, merodiploiden Kolonien, die auch Minizellen produzieren, gesucht.

Da die Minizellenbildung eine nicht-selektive Markierung ist, war das Auffinden solcher Mutanten schwierig. Eine Erleichterung ergab sich dadurch, daß es meist Filamentbildner sind, die bevorzugt Minizellen bilden und die unter dem Binokular an ihren marmorierten Kolonien zu erkennen sind. Daher wurde nach der Mutagenese nach marmorierten Kolonien gesucht und diese dann im Mikroskop hinsichtlich Filament- und Minizellenbildung überprüft.

Der diploide Minizellenbildner 171-716Mz

Die Mutagenese des gelben Rezipienten 1-716 mit Nitrit ließ zunächst nur instabile Filamentbildner entstehen. Zwei weitere, sich anschließende Mutagenisierungen führten über stabile Filamentmutanten mit schwacher Minizellenbildung schließlich zu guten Minizellenproduzenten. Die meisten von ihnen verloren jedoch nach einiger Zeit diese Eigenschaft wieder.

14 stabile Minizellenbildner (1-716Mz/a - x) wurden mit dem rosa Donor 1-171 gekreuzt. Es entstanden neben rosa und gelben Rekombinanten braune, diploide Kolonien (<1%). Viele zeigten wieder normale Zellformen oder waren schlechte Minizellenproduzenten geworden. Schließlich waren noch vier diploide, stabile Minizellenbildner vorhanden; sie erhielten die Bezeichnungen 171-716Mz/1 - 4.

Der diploide Minizellenbildner 171-536

In der Stammsammlung Heumann befand sich bereits ein gelber, filament- und minizellenbildender Stamm mit der Nummer 1-536. Bei der Kreuzung mit dem Donor 1-171 gelang es auch hier, neben sehr vielen gelben und wenigen rosa Rekombinanten wenigstens eine braune, diploide Kolonie zu finden, die zugleich eine sehr gute Minizellenproduktion aufwies. Dieser neue Stamm erhielt die Bezeichnung 171-536.

1.3.3. Vergleichende DNA-Untersuchung von Minizellen haploider und diploider Stämme

Die Minizellen folgender Stämme wurden verglichen:

diploid		haploid
171-536	mit	1-536
171-716Mz	mit	1-716Mz

1.3.3.1. Anzucht

Die für die Minizellenpräparation übliche Anzucht in Flüssigmedium führte bei den o.a. Stämmen nur zur Bildung sehr langer Filamente, nicht aber zur Entstehung von Minizellen. Die Stämme wurden daher auf Festmedium angezogen, wo sie kurze Filamente und viele Minizellen produzierten. Für die diploiden Stämme wurden MM-Platten verwendet, um das Wachstum haploider Segreganten einzuschränken.

1.3.3.2. Isolierung der Minizellen

Die Isolierung und Reinigung der Minizellen erfolgte durch differentielle Zentrifugation und zwei aufeinanderfolgende Sucroseläufe. Nach Abschluß der Isolierung stand jeweils eine Minizellensuspension von 1 ml zur Verfügung.

1.3.3.3. Ermittlung der Reinheit der Minizellenisolate

Jedes Minizellenpräparat enthielt noch teilungsfähige Zellen, deren Anteil auf folgende Weise berechnet wurde:

- a) Ermittlung der Zahl der teilungsfähigen Zellen in der Minizellenfraktion (1 ml) durch Verdünnungsreihe auf NB-Platten und Zählen der sich bildenden Kolonien.
- b) Bestimmung der Summe der teilungsfähigen Zellen und Minizellen in der Minizellenfraktion mit einer Neubauer Zählkammer ($1/400 \text{ mm}^2 \times 0,02 \text{ mm}$ Volumen).
- c) Anteil teilungsfähiger Zellen in Prozent =

$$= \frac{\text{Summe teilungsfähiger Zellen}}{\text{Summe teilungsfähiger Zellen} + \text{Minizellen}} \times 100$$

In der Tabelle 2 sind diese Werte für die Minizellenpräparate der Stammpaare 1-536/171-536 und 1-716Mz/171-716Mz zusammengestellt.

1.3.3.4. Lyse der Minizellen

Die Minizellen wurden nach dem Sarkosylverfahren lysiert. Für den Vergleich des DNA-Gehalts von Minizellen haploider und diploider Stämme in der analytischen UZ war es notwendig, die Menge kontaminierender DNA der teilungsfähigen Zellen einander anzupassen. Daher wurde, von den Minizel-

Stamm	tf. Zellen	Minizellen + tf. Zellen	Prozent tf. Zellen
1-536	$4,0 \times 10^7$	$7,2 \times 10^{10}$	0,06
171-536	$7,0 \times 10^7$	$8,4 \times 10^{10}$	0,08
1-716Mz	$4,4 \times 10^5$	$6,7 \times 10^9$	0,007
171-716Mz	$2,6 \times 10^5$	$7,2 \times 10^9$	0,004

Tabelle 2: Zusammensetzung von Minizellen-
fraktionen nach der Reinigung
"tf" = teilungsfähig
Alle Werte auf 1 ml bezogen

lenfraktionen der beiden zu vergleichenden Stämme jeweils so viel Suspension lysiert, daß die Zahl teilungsfähiger Zellen ungefähr übereinstimmte, wobei nicht berücksichtigt werden konnte, daß Zellen diploider Stämme etwas mehr DNA enthalten.

Für das Paar 1-536 und 171-536 ergaben sich unter Berücksichtigung der Werte aus Tabelle 2 folgende zu lysierende Mengen:

1-536 : 1 ml mit $4,0 \times 10^7$ lebenden Zellen
171-536 : 0,57 ml mit $4,0 \times 10^7$ lebenden Zellen

Für das Paar 1-716Mz und 171-716Mz ergaben sich für

1-716Mz : 0,6 ml mit $2,6 \times 10^5$ lebenden Zellen
171-716Mz: 1 ml mit $2,6 \times 10^5$ lebenden Zellen

1.3.3.5. Untersuchung der Minizellenlysate in der analytischen Ultrazentrifuge

Der DNA-Gehalt der Minizellenlysate wurde durch CsCl-Dichtegradientenzentrifugation in der analytischen UZ ermittelt.

Die Abbildung 1 zeigt die Ergebnisse für die Minizellen von 1-536 und 171-536, die Abbildung 2 für die Minizellen von 1-716Mz und 171-716Mz.

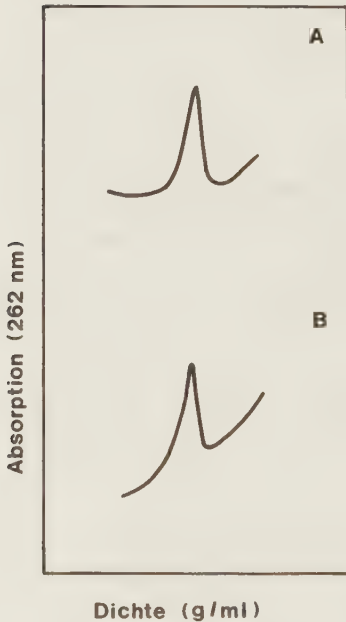


Abbildung 1:

A) DNA-Profil der Minizellen von 1-536

B) DNA-Profil der Minizellen von 171-536

Die DNA-Bandierung wurde durch Absorption bei 262 nm nachgewiesen.

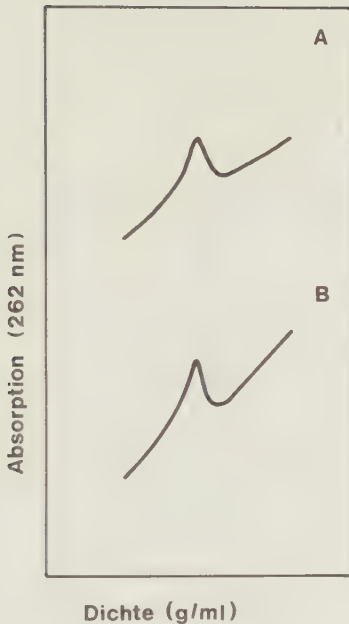


Abbildung 2:

A) DNA-Profil der Mini-
zellen von 1-716Mz

B) DNA-Profil der Mini-
zellen von 171-716Mz

Die DNA-Bandierung wurde
durch Absorption bei 262 nm
nachgewiesen.

Gesamtergebnis für 1-536/171-536 und 1-716Mz/171-716Mz

- a) Für beide Stammpaare stimmen die Ergebnisse überein.
- b) Die DNA-Gipfel der Minizellenfraktionen der haploiden und der diploiden Stämme sind gleichgroß, sie stellen die DNA der teilungsfähigen Zellen dar.
- c) Die Minizellen diploider Zellen enthalten ebenso wie die Minizellen haploider Stämme keine DNA.

1.3.3.6. EM-Untersuchungen von DNA aus Minizellenpräparaten

Zur Bestätigung der o.a. Ergebnisse wurde auch DNA der Minizellenfraktionen von 1-536 und 171-536 über einen präparativen CsCl-Gradienten isoliert und im EM betrachtet.

Beide Isolate enthielten nur lineare DNA-Stücke, die von der chromosomalen DNA der lebenden Zellen stammten. Plasmide konnten nicht gefunden werden. Deswegen soll hier auf diese Versuche nicht weiter eingegangen werden.

1.3.4. Funktionsfähigkeit der Minizellen von 171-536

Das negative Ergebnis der Minizellenuntersuchungen konnte 2 Ursachen haben:

1. Der Exogenot konnte aufgrund seines Zustandes in der diploiden Zelle nicht in die Minizellen segregieren.
2. Die Minizellen waren - aus welchen Gründen auch immer - nicht in der Lage, extrachromosomale DNA aufzunehmen.

Die 2. Möglichkeit konnte auf folgende Weise geprüft werden: Es ist bekannt, daß R- und Col-Plasmide, die in Minizellen von R. lupini (32) bzw. E. coli (16, 17) segregiert sind, aus einer gereinigten Minizellenfraktion weitgehend frei von chromosomaler DNA im CsCl-Gradienten nachgewiesen werden können, in Präparationen normaler Zellen jedoch nur einen Bruchteil gemessen an der chromosomalen DNA darstellen. Dieser Nachweis sollte für einen diploiden Minizellenbildner geführt werden. Auf den Stamm 171-536 wurde das RP4-Plasmid übertragen. Das Lysat normaler Zellen von 171-536(RP4) und das einer Minizellenfraktion von 171-536 (RP4) wurde im CsCl-Dichtegradienten in der analytischen Ultrazentrifuge untersucht. Die Zugabe einer Referenz-DNA (E. coli NC22, $\rho = 1,710 \text{ g/ml}$) ermöglichte die Identifizierung der DNA-Banden von R. lupini und des RP4-Plasmids.

Die Abbildungen 3 und 4 zeigen die Ergebnisse für 171-536(RP4) und für Minizellen des gleichen Stammes.

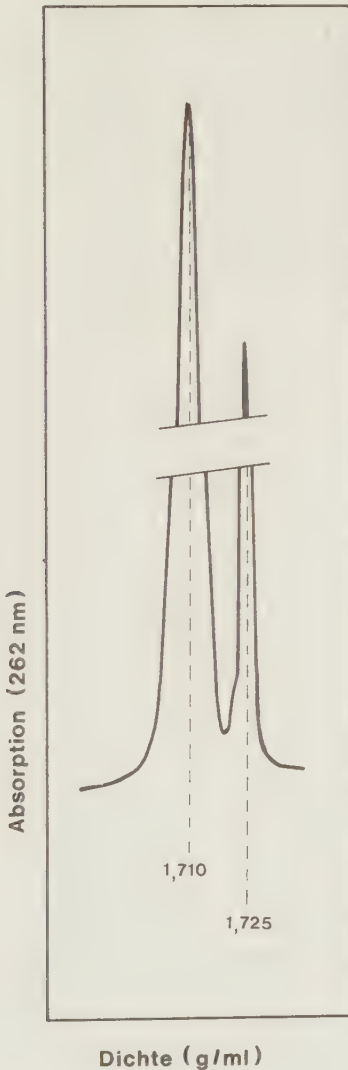


Abbildung 3:

DNA-Profil von 171-536(RP4)
im CsCl-Dichtegradienten
in der analytischen UZ.
Die DNA-Bandierung wurde
durch Absorptionsmessung
bei 262 nm ermittelt.

$\rho = 1,725 \text{ g/ml}$:

DNA von *R. lupini* 171-536(RP4)
mit linksseitiger RP4-Schul-
ter

$\rho = 1,710 \text{ g/ml}$:

Referenz-DNA von *E. coli*
NC22

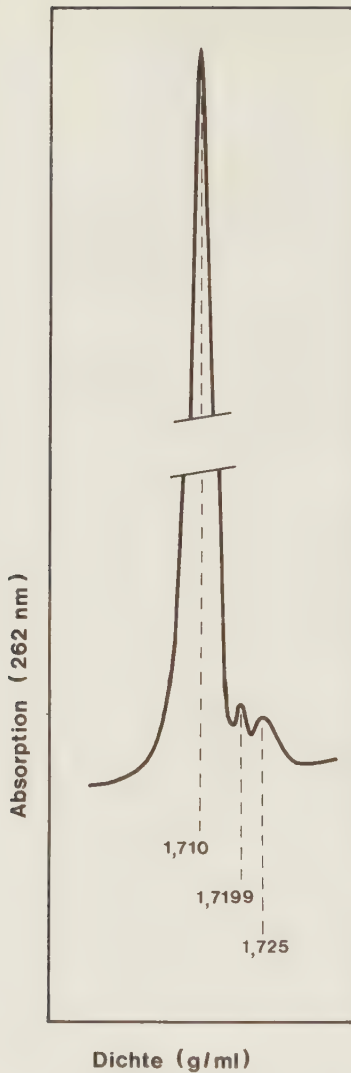


Abbildung 4:

DNA-Profil der Minizellen-
fraktion von 171-536(RP4)
im CsSl-Dichtegradienten
in der analytischen UZ.

Die DNA-Bandierung wurde
durch Absorptionsmessung
bei 262 nm ermittelt.

$\rho = 1,725 \text{ g/ml}$:

DNA von *R. lupini* 171-536(RP4)

$\rho = 1,7199 \text{ g/ml}$: RP4-DNA

$\rho = 1,710 \text{ g/ml}$:

Referenz-DNA von *E. coli*

NC22

Während bei 171-536(RP4) die RP4-DNA nur als kleine Schulter links von der R. lupini DNA zu erkennen ist (Abb. 3), hat bei den Minizellen von 171-536(RP4) der Anteil chromosomaler DNA erheblich abgenommen, die RP4-DNA dagegen ist überproportional verteten (Abb. 4). Damit war bewiesen, daß die Minizellen von 171-536 extrachromosomale Elemente aufnehmen können.

2. Genetische Experimente

2.1. Allgemeine Darstellung des Versuchsablaufs

Die molekularbiologischen Experimente konnten über den Zustand des Exogenoten in der merodiploiden Zelle keine eindeutige Auskunft geben. Daher wurde versucht, dieses Problem mit genetischen Methoden zu lösen.

Der Grundgedanke beruhte darauf, daß bei der Kreuzung eines diploiden Donorstammes mit einem Rezipienten bei integriertem Exogenoten die beiden Karotinoidregionen gemeinsam auf den Rezipienten transferiert werden könnten und dabei u.a. diploide Rekombinanten mit der Komplementfarbe des diploiden Donors entstehen würden. Bei einem als Replikon vorliegenden Exogenoten käme es nur zur Übertragung einer der beiden Karotinoidregionen. Das Ergebnis wären haploide Rekombinanten.

Im Folgenden soll der Versuchsablauf zum Beweis einer der o.a. Alternativen kurz dargestellt werden. In den Abschnitten 2.2., 2.3. und 2.4. soll dann auf die Ergebnisse mit den verschiedenen diploiden Stämmen genauer eingegangen werden.

- Da von bereits vorhandenen, diploiden Stämmen nur 44-716, nicht aber 171-712 und 171-716 c-Regionentransfer zeigten, wurden durch weitere Kreuzungen neue diploide Donorstämme, 44-690 und 171-43, für Transferversuche gewonnen.

- Auxotrophe Mutanten von 44-716, 171-43 und 44-690 wurden durch Nitritmutagenese hergestellt. Ihre Markierungen mußten alle im haploiden Bereich der c-Region oder in der d-Region liegen, da im diploiden Bereich eine Mutation gleichzeitig und an derselben Stelle von Exo- und Endogenot stattfinden müßte, um nicht durch Komplementation verdeckt zu bleiben. Ob eine neue Mutante in der c- oder d-Region markiert ist, wurde durch Schnellkreuzungen mit dem c-Regionen-Donor 1-574 und dem d-Regionen-Donor 1-388 festgestellt. Gab es nur mit 1-574 Rekombinanten, so war die Mutante in der c-Region markiert, Rekombinanten mit 1-388 wiesen auf eine Markierung in der d-Region hin.
- Die Kreuzungen mit verschiedenen Rezipienten erfolgten durch Mischen der Übernachtskulturen und Ausspateln geeigneter Verdünnungsstufen auf MM+NB-Platten. Von den ungemischten Kulturen wurden Kontrollplatten angelegt. Nach 12 Tagen wurden die Rekombinanten gezählt und durch Passagen auf Vollmedium weiter untersucht.
- Da jeder diploide Stamm eine mehr oder weniger starke Aufspaltung in haploide Segreganten zeigt, waren an der Entstehung von Rekombinanten bei den Kreuzungen auch seine Segreganten beteiligt. Der Grad der Segregation im Augenblick der Durchführung der Kreuzung war deswegen von Interesse. Eine Verdünnungsreihe der für die Kreuzung angezogenen Übernachtskulturen der diploiden Stämme

wurde vor der Mischung mit den Rezipientenkulturen auf NB-Platten ausgespatelt und der Anteil der gewachsenen haploiden und diploiden Kolonien ermittelt. Um die Zahl der Segreganten möglichst gering zu halten, wurden die diploiden Stämme vor einer Verwendung immer wieder reisoliert.

2.2. Der diploide Stamm 44-716

2.2.1. Eigenschaften von 44-716

Die Kreuzung von 1-44 mit 1-716 führte zur Entstehung einer Reihe merodiploider, brauner Stämme, die als 44-716 a - k bezeichnet wurden (11, 27). Die c-Regionen der beiden Elternstämme mit ihren Markierungen sind in der Abbildung 5 dargestellt.

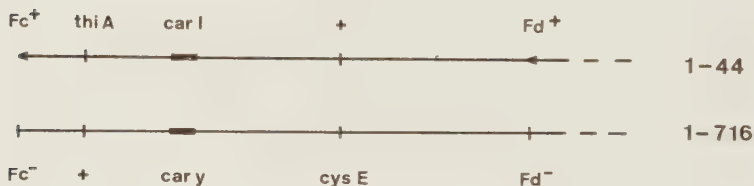


Abbildung 5: Schema mit den Markierungen von 1-44 und 1-716 in der c-Region.

2.2.2. Segregantenanalyse von 44-716

Die Stämme 44-716 a - k besaßen, obwohl sie aus der gleichen Kreuzung stammten, eine unterschiedlich stark ausgeprägte Neigung, Segreganten zu bilden (11, 27).

Für die Stämme 44-716 a, c, d, f und k wurden daher genaue Segregantenanalysen durchgeführt:

Von jedem der 5 Stämme wurden je 2 oder 3 braune Kolonien von MM-Platten abgenommen und einzeln auf Vollmedium über 3 Passagen zu einem Rasen vermehrt, von dem anschließend eine Verdünnungsreihe auf NB-Platten ausgespatelt wurde, um Einzelkolonien von den während der Anzucht gebildeten Segreganten zu erhalten. Die Verdünnungsreihe wurde auf folgende Weise ausgewertet:

1. Die Auxotrophiemarkierungen von je 100 rosa und je 100 gelben Segreganten eines jeden der Klone wurden durch Stempeln auf MM-, MM+Cys-, MM+Thi- und MM+Cys+Thi-Platten ermittelt.
2. Die gelben und rosa Kolonien von 2 NB-Platten wurden gezählt und der Anteil jeder Farbe an der Gesamtzahl der Segreganten berechnet.

Aus den Ergebnissen von 1. und 2. wurde anschließend der Anteil der 8 möglichen Segregantentypen ermittelt (siehe Tabelle 3). Da die Segregantenanalysen der jeweils parallel untersuchten Klone des gleichen diploiden Stammes weitgehend übereinstimmende Ergebnisse brachten, sind die Angaben in der Tabelle 3 Mittelwerte.

Segreganten	44-716				
	a	c	d	f	k
car y, prt	62,3	2,7	1,5	0,4	72,8
car y, cysE	19,0	87,0	96,1	1,9	24,3
car y, thi	---	---	---	---	---
car y, thi cysE	---	---	---	---	---
car 1, prt	3,1	8,7	1,8	77,2	0,4
car 1, cysE	15,6	1,6	0,6	20,5	2,5
car 1, thi	---	---	---	---	---
car 1, thi cysE	---	---	---	---	---
Summe	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0

Tabelle 3: Segregationsverhalten der diploiden Stämme
44-716 a, c, d, f und k
Alle Angaben in Prozent

Ergebnis:

- Die Thiamin-Markierung des Elternstammes 1-44 tritt bei den Segreganten nie auf.
- Die Segregationsmuster der 5 diploiden Stämme sind unterschiedlich.

2.2.3. Auxotrophe Mutanten von 44-716

Die diploiden Stämme 44-716 a - k waren durch Komplementation prototroph. Durch Mutagenisierung mit Natriumnitrit wurden von den Stämmen 44-716 a, c, f und k auxotrophe Mutanten hergestellt (III.5.6. und IV.2.1.). In der Ta-

belle 4 sind alle zur Anwendung gekommenen Mutanten mit ihren Eigenschaften aufgezählt.

Durch Schnellkreuzungen mit verschiedenen Rezipienten wurde festgestellt, daß alle Mutanten Donoren für die c-Region sind, d.h. die Fc^+ -Eigenschaft von 1-44 muß in das Chromosom von 1-716 einrekombiniert worden sein.

Mutante	Markierung	Ort der Markierung
44-716 a1	aux	d-Region
44-716 c2	arg	d- "
44-716 f8	aux	d- "
44-716 f14	his	c- "
44-716 f17	cys	c- "
44-716 k2	aux	c- "
44-716 k3	aux	d- "

Tabelle 4: Eigenschaften der auxotrophen Mutanten von 44-716 a, c, f und k.

"aux" bedeutet: Auxotrophie unbekannt, da mit keinem Supplement auf MM Wachstum.

2.2.4. Kreuzungen auxotropher Mutanten von 44-716 mit Rezipienten

Für die Kreuzungen wurden 5 verschiedene Rezipienten verwendet, deren Markierungen in der Abbildung 6 dargestellt sind:

1-590 thi A, car 1
 1-593 ade B, car 1
 1-716 cys E, car y
 1-711 ade F, car citr
 1-921 cys O, car p

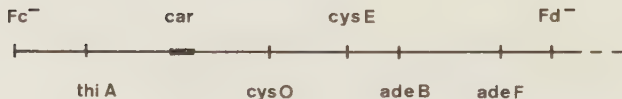


Abbildung 6: Genkarte der c-Region von *Rhizobium lupini* mit den Markierungen der an den Kreuzungen mit auxotrophen Mutanten von 44-716 beteiligten Rezipienten.

Da fast keine geeigneten Rezipienten mit einer dritten Farbe, z.B. Hellgelb oder Rosa, zur Verfügung standen, mußten drei Rezipienten eingesetzt werden, die wie die Segreganten von 44-716 weiß oder gelb gefärbt waren. Da es bei den Kreuzungen jedoch vor allem auf den Beweis des Transfers der diploiden Region auf die Rezipienten durch die Entstehung brauner Rekombinanten ankam, war dies ohne Einfluß auf den Aussagewert der Experimente.

2.2.4.1. Aufspaltung der diploiden Donoren

Auf den Stammplatten und während der Anzucht für die Kreuzungen wurden von den Donorstämmen haploide Segreganten gebildet, die sich ihrerseits auch an den Kreuzungen mit den Rezipienten beteiligten. Alle 5 Genotypen

einer solchen Donorpopulation sind in Tabelle 5 dargestellt.

Farbe	Genotyp	
braun	$\frac{\text{car } y \quad \text{cys } E^-}{\text{car } l \quad \text{cys } E^+} \quad \text{aux } X^-$	merodiploid
gelb	$\text{car } y \quad \text{cys } E^- \quad \text{aux } X^-$ $\text{car } y \quad \text{cys } E^+ \quad \text{aux } X^-$	haploid
weiß	$\text{car } l \quad \text{cys } E^- \quad \text{aux } X^-$ $\text{car } l \quad \text{cys } E^+ \quad \text{aux } X^-$	haploid

Tabelle 5: Genotypen der an den Kreuzungen beteiligten Donorklone

aux X = zusätzliche Markierung durch Mutagenese von 44-716 a - k (s. Tab. 4, Spalte 2)

Zur Ermittlung des Anteils haploider Segreganten zum Zeitpunkt der Durchführung der Kreuzungen wurden Verdünnungsreihen der angezogenen Kulturen der diploiden Stämme auf NB-Platten ausgespatelt und die Anteile der verschiedenen Farben der angewachsenen Kolonien berechnet (Tabelle 6).

Mutante	Segregantenanteil in Prozent		
	br	y	l
44-716 a1	48,3	43,0	8,7
44-716 c2	49,5	49,7	0,8
44-716 f8	72,5	2,9	24,6
44-716 f14	55,5	8,2	36,3
44-716 f17	70,6	1,5	27,9
44-716 k2	72,0	28,0	0,0
44-716 k3	86,9	12,8	0,3

Tabelle 6: Aufspaltung der auxotrophen Donorstämme 44-716 a1 - k3 zum Zeitpunkt der Durchführung der Kreuzungen mit verschiedenen Rezipienten.

2.2.4.2. Ergebnisse der Kreuzungen

Die Ergebnisse der Kreuzungen mit den verschiedenen Rezipienten sind in den Tabellen 7 - 11 zusammengefaßt. Die dort angegebenen Anteile der verschiedenen Rekombinanten in Prozent sind Mittelwerte von 4 - 6 MM+NB-Platten der Verdünnungsstufen I, II und III. Die Rekombinationsrate wurde stets für die Verdünnungsstufe II berechnet (s. Kap. III.5.4.). Fast alle Donoren und Rezipienten bildeten auf den MM+NB-Kontrollplatten keine Rückmutanten. Nur bei 44-716 a1 betrug die Rückmutationsrate $1,3 \times 10^{-8}$. Die Segregation der diploiden Rekombinanten wurde durch fraktioniertes Ausstreichen auf festem NB-Medium untersucht.

a) Kreuzungen mit dem Rezipienten 1-590

Aus den Kreuzungen mit dem weißen Rezipientenstamm 1-590 gingen weiße, gelbe, braune und sektorierte Kolonien hervor, deren prozentuale Anteile in der Tabelle 7 zusammengefaßt sind.

Donor	Anteil der Rekombinanten in %				Rek.-rate Verd. II
	br	y	l	sekt.	
44-716 a1	39,2	46,1	13,8	0,9	$1,5 \times 10^{-6}$
44-716 c2	76,2	3,3	19,2	1,3	$6,7 \times 10^{-8}$
44-716 f8	35,0	1,5	62,6	0,9	$1,6 \times 10^{-6}$
44-716 f14	1,2	1,8	96,5	0,5	$5,6 \times 10^{-6}$
44-716 f17	3,5	1,4	94,4	0,7	$5,0 \times 10^{-7}$
44-716 k2	5,8	9,0	84,6	0,6	$5,4 \times 10^{-7}$
44-716 k3	77,3	17,0	5,0	0,7	$3,3 \times 10^{-6}$

Tabelle 7: Verteilung der Rekombinantenfarben bei den Kreuzungen 44-716 a1 - k3 x 1-590.

Die Untersuchung einiger brauner Rekombinanten aus den Kreuzungen 44-716 a1, c2, k2 und k3 x 1-590 ergab, daß alle wieder gelbe und weiße Segreganten bildeten, aber es waren Unterschiede in der Koloniemorphologie und dem Ausmaß der Segregation zu beobachten.

b) Kreuzungen mit dem Rezipienten 1-593

Die Tabelle 8 umfaßt die Ergebnisse der Kreuzungen mit dem weißen Rezipienten 1-593. Wegen zu geringer Zahl von Rekombinanten auch bei Verdünnungsstufe I konnten die Kreuzungen 44-716 k2, f17 x 1-593 nicht ausgewertet werden und sind daher in der Tabelle nicht aufgeführt.

Donor	Anteil der Rekombinanten in %			Rek.-rate Verd. II
	br	y	l	
44-716 a1	31,7	36,6	31,7	$3,0 \times 10^{-8}$
44-716 c2	89,9	1,1	9,0	$4,0 \times 10^{-8}$
44-716 f8	25,6	2,3	72,1	$5,3 \times 10^{-8}$
44-716 f14	1,9	3,6	94,5	$2,5 \times 10^{-6}$
44-716 k3	82,3	15,8	1,9	$4,4 \times 10^{-7}$

Tabelle 8: Verteilung der Rekombinantenfarben bei den Kreuzungen 44-716 a1 - k3 x 1-593.

Sektorierte Kolonien wurden nicht beobachtet.

Die Untersuchung von jeweils 16 braunen Rekombinanten der Kreuzungen c2, k3 und f14 x 1-593 über 2 Passagen auf Vollmedium ergaben fast vollständige Übereinstimmung mit Koloniemorphologie und Segregationsverhalten der Donorstämme.

c) Kreuzungen mit dem Rezipienten 1-716

Der Rezipient 1-716 wurde ausgewählt, da einerseits aus ihm die diploiden Stämme 44-716 hervorgegangen waren und er andererseits daher die gleiche Cys E-Markierung trug wie ein Teil der gelben und weißen Segreganten von 44-716. Die an der Kreuzung durch die Aufspaltung der Donoren 44-716 a1 - k3 beteiligten Segreganten vom Typ $\text{car } 1\text{-cysE}^-$ - auxX^- und $\text{car } \gamma\text{-cysE}^-$ - auxX^- (s. Tab. 5) blieben daher ohne Einfluß auf das Ergebnis, da sie mit 1-716 keine Rekombinanten bilden konnten. Die Resultate der Kreuzungen sind aus der Tabelle 9 zu ersehen.

Donor	Anteil der Rekombinanten in %			Rek.-rate Verd. II
	br	y	1	
44-716 a1	60,0	52,0	8,0	$1,6 \times 10^{-6}$
44-716 c2	80,8	14,7	4,5	$1,0 \times 10^{-7}$
44-716 k2	37,0	62,0	1,0	$4,7 \times 10^{-6}$
44-716 k3	43,9	55,6	0,5	$3,4 \times 10^{-6}$

Tabelle 9: Verteilung der Rekombinantenfarben bei den Kreuzungen 44-716 a1 - k3 x 1-716.

Die braunen Rekombinanten wurden nicht weiter untersucht.

d) Kreuzungen mit dem Rezipienten 1-921

Bei den Kreuzungen von 44-716 a1 - k3 mit dem rosa Rezipienten 1-921 entstanden gelbe, rosa, weiße, braune und sektorierte Rekombinanten (Tabelle 10). Der Donor 44-716 c2 ergab für eine Auswertung zu wenig Rekombinanten; mit 44-716 f8 - f17 wurden keine Kreuzungen mit 1-921 durchgeführt.

Donor	Anteil der Rekombinanten in %					Rek.-rate Verd. II
	br	y	l	p	sekt.	
44-716 a1	9,3	50,4	10,8	28,1	1,4	$1,7 \times 10^{-7}$
44-716 k2	23,4	39,2	1,2	34,8	1,4	$2,6 \times 10^{-6}$
44-716 k3	24,3	34,4	0,9	38,9	1,5	$1,0 \times 10^{-6}$

Tabelle 10: Verteilung der Rekombinantenfarben bei den Kreuzungen 44-716 a1 - k3 x 1-921.

Das Segregationsverhalten von je 20 braunen Rekombinanten der o.a. Kreuzungen wurde untersucht:

- Die Segreganten der meisten merodiploiden Rekombinanten waren wieder gelb und weiß.
- Ein Viertel der braunen Rekombinanten bildete dagegen gelbe und rosa Segreganten.
- Je eine Rekombinante aus jeder Kreuzung spaltete rosa, gelbe und weiße Segreganten ab.

e) Kreuzungen mit dem Rezipienten 1-711

In der Tabelle 11 sind die Ergebnisse der Kreuzungen von 44-716 a1 - k3 mit dem zitronengelben Rezipienten 1-711 angeführt. Die Kreuzung mit 44-716 k2 ergab so wenige Rekombinanten, daß ihre quantitative Auswertung unmöglich war.

Donor	Anteil der Rekombinanten in %					Rek.-rate Verd. II
	br	y	l	citr	sekt	
44-716 a1	44,9	47,5	7,6	0,0	0,0	$3,0 \times 10^{-7}$
44-716 c2	95,0	2,4	1,0	1,6	0,0	$4,1 \times 10^{-7}$
44-716 f8	68,6	2,7	24,0	3,8	0,9	$1,6 \times 10^{-6}$
44-716 f14	52,3	2,7	6,5	38,5	0,0	$2,3 \times 10^{-7}$
44-716 f17	2,5	4,7	5,9	86,1	0,8	$1,9 \times 10^{-6}$
44-716 k3	79,1	19,7	0,1	1,1	0,0	$5,9 \times 10^{-5}$

Tabelle 11: Verteilung der Rekombinantenfarben bei den Kreuzungen 44-716 a1 - k3 x 1-711.

Von allen 6 Kreuzungen wurde das Segregationsverhalten von je etwa 20 braunen Rekombinanten untersucht. Fast alle bildeten wieder weiße und gelbe Segreganten, entsprachen also dem Stamm 44-716, nur bei der Kreuzung 44-716 f17 x 1-711 fanden sich drei, die gelbe und zitronenfarbene Segreganten erzeugten.

2.2.4.3. Zusammenfassendes Ergebnis der Kreuzungen

- a) Bei fast allen Kreuzungen entstand ein hoher Anteil brauner, diploider Rekombinanten, die wieder das Segregationsverhalten der Donoren zeigten.
- b) Durch die Verwendung von Rezipienten mit einer von den gelben und weißen Segreganten der Donoren abweichenden rosa oder zitronengelben Farbe wurde deutlich gemacht, daß unter den braunen, diploiden Rekombinanten auch einige wenige mit ausgetauschten Farbkombinationen (car p - car y bzw. car citr - car y statt car y - car 1) auftraten. Auf deren Entstehung wird in der Diskussion eingegangen.
- c) Aus den Kreuzungen 44-716 a1 - k3 mit 1-921 sind offenbar triploide Rekombinanten entstanden, da eine Aufspaltung in alle drei beteiligte Farben zu beobachten ist.

2.3. Der diploide Stamm 171-43

2.3.1. Entstehung und Eigenschaften von 171-43

Bei der Kreuzung der beiden Stämme 1-171 und 1-43 entstanden Rekombinanten mit der folgenden Farbverteilung:

89,7 % gelb (hellgelb - dunkelgelb)

9,6 % rosa

0,6 % sektoriert

0,1 % braun

2 braune Kolonien wurden auf Vollmediumplatten fraktioni-
niert ausgestrichen; sie bildeten gelbe und rosa Segregan-
ten, waren also diploid. Sie erhielten die Stammbezeich-
nung 171-43 a bzw. 171-43 b. Die Abbildung 7 zeigt die
Markierungen der c-Regionen der an der Bildung von 171-43
beteiligten Elternstämme 1-171 und 1-43.

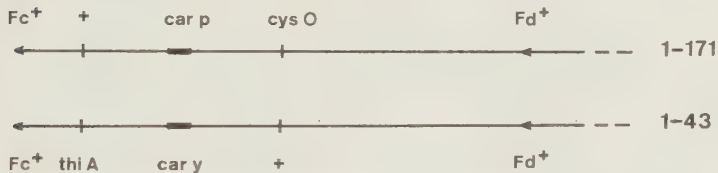


Abbildung 7: Schema der Markierungen von 1-171 und 1-43

2.3.2. Segregantenanalyse von 171-43 a und b.

Von jedem der beiden Stämme wurde das Segregationsverhal-
ten an jeweils 2 braunen Kolonien untersucht. Die Ermitt-
lung der Anteile der verschiedenen Segregantentypen er-
folgte nach der bei 44-716 angewandten Methode (s. S. 33),
die Ergebnisse sind in der Tabelle 12 zusammengefaßt.

Alle Angaben sind Mittelwerte der beiden parallel untersuchten Klone von 171-43 a und b.

Segregantentypen	171-43 a	171-43 b
car y, prt	0,3 %	96,7 %
car y, cys0	9,9 %	2,0 %
car y, thi	---	---
car y, thi cys0	---	---
car p, prt	87,1 %	1,0 %
car p, cys0	2,7 %	0,3 %
car p, thi	---	---
car p, thi cys0	---	---
Summe	100,0 %	100,0 %

Tabelle 12: Segregationsverhalten der diploiden Stämme 171-43 a und 171-43 b.

Ergebnis:

- Die Thiamin-Markierung des Elternstammes 1-43 trat bei den Segreganten nie auf.
- Die Segregationsmuster von 171-43 a und b waren verschieden.

2.3.3. Auxotrophe Mutanten von 171-43

Von den durch Komplementation prototrophen Stämmen 171-43 a und b wurden durch Nitritmutagenese auxotrophe Mutanten hergestellt (s. III.5.6.* und IV.2.1.). Aus einer

größeren Anzahl Mutanten waren nur zwei verwendbar, deren Auxotrophie sich jedoch nicht ermitteln ließ:

171-43 b4 auxX car br Fc⁺Fd⁺

171-43 b6 auxY car br Fc⁺Fd⁺

2.3.4. Kreuzungen von 171-43 b4 und b6 mit Rézipienten

Für die Kreuzungen zum Nachweis eines gekoppelten Transfers der beiden Karotinoidregionen car p/car y von 171-43 b4 und b6 wurden drei Rézipienten ausgewählt, die eine von den Donoren abweichende Farbmarkierung trugen und an verschiedenen Stellen der c-Region auxotroph markiert waren (s. Abb. 6, S. 36).

1-590 thi A, car l

1-593 ade B, car l

1-711 ade F, car citr

Die Kreuzungen wurden nach der im Methodenteil unter III. 5.4. angegebenen Weise durchgeführt. Außerdem wurde zusätzlich der Segregationsgrad des diploiden Donors ermittelt.

2.3.4.1. Aufspaltung des Donors 171-43 b4

Der Anteil der einzelnen Farbtypen und alle an der Kreuzung beteiligten Genotypen sind in der Tabelle 13 dargestellt.

Farbe der Kolonien	Anteil in % *)	Genotyp
braun	52,6	$\frac{\text{car y cys } 0^+}{\text{car p cys } 0^-} \text{ aux } X^-$
gelb	44,2	$\text{car y cys } 0^- \text{ aux } X^- \text{ **})$ $\text{car y cys } 0^+ \text{ aux } X^-$
rosa	3,2	$\text{car p cys } 0^- \text{ aux } X^-$ $\text{car p cys } 0^+ \text{ aux } X^-$

Tabelle 13: Genotypen einer Population des Donors 171-43 b4 mit Aufspaltung zum Zeitpunkt der Kreuzung.

*) 2NB-Platten einer Verdünnungsreihe der Übernachtskulturen für die Kreuzung mit 1178 Kolonien wurden gezählt und die Prozente der einzelnen Farbtypen errechnet.

**) Die 4 haploiden Genotypen leiten sich aus Tabelle 12 ab. Da 171-43 b4 die zusätzliche Markierung $\text{aux } X^-$ trägt, ist diese auch bei den Segreganten zu finden.

2.3.4.2. Ergebnisse der Kreuzungen

1. 171-43 b4 x 1-590, 1-593 und 1-711

In der Tabelle 14 sind die prozentualen Anteile der einzelnen Rekombinantentypen von insgesamt 4 - 6 MM+NB-Platten der Verdünnungsstufen I, II und III als Mittelwert zusammengefaßt. Alle an den Kreuzungen beteiligten Stämme bildeten auf den MM+NB-Kontrollplatten keine Rückmutanten.

171-43 b4 x	Anteil der Rekombinanten in %					Rek.-rate Verd. II
	br	y	p	l bzw. citr	sekt.	
1-590	16,0	27,0	1,1	54,8	1,1	$3,0 \times 10^{-6}$
1-593	19,4	28,2	2,7	47,5	2,2	$2,0 \times 10^{-6}$
1-711	55,2	10,0	2,5	32,3	0,0	$7,0 \times 10^{-7}$

Tabelle 14: Verteilung der Rekombinanten der Kreuzungen
171-43 b4 x 1-590, 1-593 und 1-711

Untersuchung der braunen Rekombinanten:

Eine größere Anzahl (20 - 30) brauner Rekombinanten jeder Kreuzung wurde über 2 bis 3 Passagen auf NB-Agar zu Einzelkolonien ausgestrichen.

Ergebnis:

- a) Alle waren diploid, sie bildeten haploide Segreganten.
- b) Sie waren zum Teil nicht identisch, sondern zeigten hellbraune bis dunkelbraune Farbgebung.
- c) Bei 171-43 b4 x 1-593 konnten 3 Gruppen von diploiden Rekombinanten unterschieden werden:

Gruppe I : braun rosa + gelbe Segreganten

Gruppe II : hellbraun weiße + rosa Segreganten

Gruppe III: dunkelgelb weiße + gelbe Segreganten

Die Gruppe I trat am häufigsten auf.
- d) Die diploiden Rekombinanten von 171-43 b4 x 1-590 und 171-43 b4 x 1-711 waren nur der Gruppe I zuzuordnen.

2. 171-43 b6 x 1-590, 1-593 und 1-711

Die Ergebnisse dieser 3 Kreuzungen ähnelten denen mit 171-43 b4. Da jedoch die Rekombinanzenzahl sehr gering war, wird hier auf eine Darstellung der Ergebnisse verzichtet.

2.3.4.3. Zusammenfassendes Ergebnis der Kreuzungen

Die Kreuzungen 171-43 b4 x 1-590, 1-593, 1-711 haben gezeigt, daß Exo- und Endogenot während der Konjugation gemeinsam auf einen Rezipienten übertragen und durch Rekombination in das Rezipientenchromosom eingebaut werden können.

2.3.5. Kreuzungen der Elternstämme 1-171 und 1-43 mit 1-593.

Für die Entstehung der diploiden Rekombinanten der Gruppen II und III gab es zwei Möglichkeiten:

1. Der Donor 171-43 b4 übertrug beide Karotinoidregionen (car p - car y) auf den weißen Rezipienten 1-593. Während der Einrekombination des diploiden Bereichs in dessen Chromosom kam es zum Austausch der gelben bzw. der rosa gegen die weiße Karotinoidregion, woraus die diploiden Rekombinanten der Gruppe II (car p - car l) bzw. der Gruppe III (car l - car y) hervorgingen.
2. Rosa und gelbe, an der Kreuzung beteiligte Segreganten von 171-43 b4 (s. Tab. 13) bildeten mit 1-593 nach dem

Transfer ihrer DNA neue diploide Zygoten der Gruppe II bzw. III.

Zur Prüfung der 2. Möglichkeit wurde 1-593 mit 1-171 und 1-43 stellvertretend für entsprechende Segreganten gekreuzt und nach diploiden Kolonien gesucht.

1-171 x 1-593

Erwartungsgemäß entstanden 90,5 % weiße und 5,8 % rosa, jedoch auch 3,7 % hellbraune Rekombinanten. Nur 3 von 24 untersuchten, hellbraunen Kolonien waren eindeutig diploid und bildeten auf NB-Platten weiße und rosa Segreganten, entsprachen also den diploiden Rekombinanten der Gruppe II. Die restlichen 21 hellbraunen Kolonien spalteten nicht auf, waren also entweder haploid oder sehr stabil diploid.

1-43 x 1-593

Die Kreuzung ergab 69,6 % weiße, 26,4 % gelbe und 4 % sektorierte Rekombinanten. Dunkelgelbe, in Weiß und Gelb aufspaltende Kolonien konnten nicht gefunden werden. Die Bildung merodiploider Rekombinanten der Gruppe III konnte also nicht auf die Konjugation gelber Segreganten mit 1-593 zurückgeführt werden.

2.4. Der diploide Stamm 44-690

2.4.1. Entstehung

Aus der Kreuzung der weißen Stämme 1-44 und 1-690 (siehe Abb. 8) gingen 95,5 % prototrophe, weiße Rekombinanten hervor. Der Rest von 4,5 % verteilte sich auf 2 % gelb-weiß sektorierte und 2,5 % gelbe Kolonien. Die meisten dieser gelben Kolonien waren diploid, da fraktioniertes Ausstreichen auf NB-Agar zur Bildung weißer Segreganten führte. Diejenigen, die keine Aufspaltung zeigten, waren entweder haploid oder stabil diploid (11). Die neuen gelben, diploiden Stämme aus 1-44 x 1-690 erhielten die Bezeichnung 44-690.

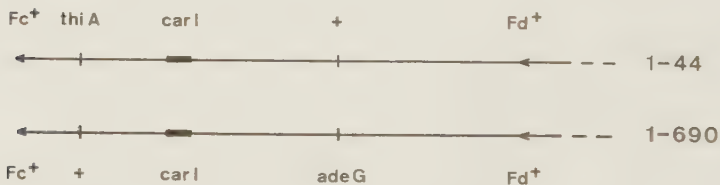


Abbildung 8: Darstellung der c-Regionen der beiden an der Bildung von 44-690 beteiligten Elternstämme 1-44 und 1-690 mit ihren Markierungen.

Ein merodiploider Abkömmling der o.a. Kreuzung wurde für weitere Untersuchungen ausgewählt.

2.4.2. Segregantenanalyse von 44-690

Die Untersuchung der Segregation konnte aus zweierlei Gründen nur unvollständig durchgeführt werden:

- Es konnte nicht unterschieden werden, ob die weiße Farbmarkierung eines Segreganten von 1-44 oder 1-690 stammte.
- Der Stempeltest auf MM, MM+Thi, MM+Ade und MM+Ade+Thi ergab nur, daß von 200 untersuchten Segreganten 73 (= 36,5 %) prototroph waren. Die restlichen 127 Segreganten wuchsen auf keinem der 4 Plattentypen. Somit konnte ausgeschlossen werden, daß sie thiaminauxotroph waren. Die beiden verbleibenden Möglichkeiten, auxotroph für Adenin und doppelt auxotroph für Adenin und Thiamin, konnten wegen der wachstumshemmenden Wirkung von Adenin als Supplement von Minimalmedium nicht unterschieden werden. Die auxotrophen Markierungen von 50 Segreganten konnten durch Schnellkreuzungen mit den Elternstämmen ermittelt werden. Alle getesteten Segreganten bildeten nur mit 1-44 und nicht mit 1-690 Rekombinanten, sie trugen also die Adeninmarkierung des Elternstammes 1-690. Doppelt auxotrophe Segreganten hätten weder mit 1-44 noch mit 1-690 Rekombinanten ergeben.

Ergebnis der Segregantenanalyse:

- Alle untersuchten Segreganten von 44-690 waren entweder auxotroph für Adenin (63,5 %) oder prototroph (36,5 %).
- Thiaminauxotrophe Segreganten wurden nicht beobachtet. (s. auch Segregantenanalysen von 44-716 und 171-43)

- 44-690 ist durch Komplementation gelb und prototroph, wobei - da beide Elternstämme Donoren für die c-Region sind - nicht bekannt ist, welcher von beiden der Rezipient ist und welcher den Exogenoten stellt.

2.4.3. Auxotrophe Mutanten von 44-690

Auxotrophe Mutanten des Stammes 44-690 wurden durch Mutagenese mit Natriumnitrit erhalten. In der Tabelle 15 sind einige Mutanten mit ihren Markierungen und Segreganten eingetragen.

Nummer der Mutante	Markierung	Segreganten
44-690/1	cys	1 + 1y
44-690/3	gly	1 + 1y
44-690/4	aux	1
44-690/10	aux	1
44-690/11	ade	1
44-690/12	cys	1 + 1y
44-690/20	cys, met	1

Tabelle 15: Auxotrophe Mutanten von 44-690

"aux" = Auxotrophie für eine unbekannte Aminosäure

Erläuterungen zu den Mutanten von 44-690:

- Bei den Mutanten 1, 3 und 12 traten plötzlich auch hellgelbe Segreganten auf, wahrscheinlich durch die Veränderung einer der beiden car 1-Genorte zu car 1y bei der Mutagenese von 44-690.
- Die Markierungen von 4 und 10 konnten trotz Austestens auf MM, supplementiert mit jeweils einer der 20 Aminosäuren, nicht ermittelt werden.
- Bei 44-690/20 lag keine Doppelauxotrophie für Cystin und Methionin vor, sondern ein Defekt in einer gemeinsamen Vorstufe der beiden Aminosäuren, da sowohl die Zugabe von Cystin als auch Methionin allein auf MM zu Wachstum der Mutante führte.
- Für die Lage der Adeninmarkierung von 44-690/11 gab es 2 Möglichkeiten:
 - a) 44-690/11 hat am die Adeninmarkierung von 1-690 komplementierenden Genomstück, welches von 1-44 stammt, eine Mutation an der gleichen Stelle, sodaß 44-690/11 für Adenin diploid auxotroph ist.
 - b) Die neue Adeninmarkierung liegt außerhalb des diploiden Bereichs.

Zur Unterscheidung der beiden Möglichkeiten wurde 44-690/11 mit 1-690 gekreuzt, wobei eine große Zahl von Rekombinanten entstand. Dies ist nur im Fall b) möglich, bei a) kann es keine Rekombinanten geben.

2.4.4. Kreuzungen von 44-690 mit Rezipienten

Zum Nachweis der Tandemanordnung von Exo- und Endogenot im diploiden Stamm 44-690 wurden dessen auxotrophe Mutanten mit den zwei weißen Rezipientenstämmen 1-590 und 1-593 gekreuzt. Da es dabei nur auf die Entstehung gelber, diploider Rekombinanten ankam, wurde in Kauf genommen, daß die durch die Aufspaltung von 44-690/1 - 20 mit an der Kreuzung beteiligten, weißen Segreganten die gleiche Farbe wie die Rezipienten trugen. Als Donoren wurden die Mutanten 1, 3, 4, 10, 11, 12 und 20 verwendet (s. Tabelle 15). Die Kreuzungen wurden wie im Methoden- teil beschrieben durchgeführt. Zusätzlich wurde durch Ausspateln einer Verdünnungsreihe der für die Kreuzung angezogenen Übernachtskultur des Donors auf NB-Platten der Anteil der diploiden Zellen an der Gesamtzahl zum Zeitpunkt der Mischung mit dem Rezipienten ermittelt (s. IV.2.1.).

2.4.4.1. Aufspaltung der diploiden Donoren

In der Tabelle 16 sind für die an den Kreuzungen beteiligten Donoren die Anteile der diploiden Zellen angegeben (Spalte b) und die Rückmutationsrate der auxotrophen Markierungen auf den MM+NB-Platten der Kontrolle angeführt.

Donor	% gelbe dipl. Zellen	Rückmut.-rate ^x
44-690/1	86,8	$1,7 \times 10^{-8}$
44-690/3	82,6	$3,3 \times 10^{-9}$
44-690/4	80,1	$1,2 \times 10^{-7}$
44-690/10	89,0	$4,7 \times 10^{-8}$
44-690/11	80,3	$3,3 \times 10^{-9}$
44-690/12	89,8	$3,3 \times 10^{-9}$
44-690/20	84,9	$3,3 \times 10^{-9}$

Tabelle 16: Segregation und Rückmutationsraten der auxotrophen Mutanten von 44-690 zum Zeitpunkt der Kreuzung mit 1-590 und 1-593.

^x) Rückmutationsrate = Zahl der Rückmutanten/
Zahl der Zellen auf der Kontrollplatte

2.4.4.2. Ergebnisse der Kreuzungen

Die Ergebnisse der Kreuzungen mit 1-590 und 1-593 sind in den Tabellen 17 und 18 dargestellt. Alle Angaben sind Mittelwerte von je 2 MM+NB-Platten der Verdünnungsstufen I, II und III.

Eine größere Anzahl der gelben Rekombinanten der Kreuzungen 44-690/1, 11, 12, 20 x 1-590, 1-593 wurden über mindestens 2 Passagen auf NB-Platten zu Einzelkolonien ausgestrichen. Alle untersuchten Rekombinanten zeigten eine den Donoren entsprechende Aufspaltung: 44-690/11 und 20 nur

Donor	Anteil der Rekombinanten in %				Rek.-rate Verd. II
	y	1	ly ^x	sekt	
44-690/1	5,2	93,6	1,2	0,0	$1,8 \times 10^{-5}$
44-690/3	5,9	94,1	0,0	0,0	$1,4 \times 10^{-6}$
44-690/4	61,7	37,9	---	0,4	$6,2 \times 10^{-6}$
44-690/10	11,5	88,5	---	0,0	$7,1 \times 10^{-7}$
44-690/11	19,6	80,2	---	0,2	$1,1 \times 10^{-6}$
44-690/12	6,8	92,3	0,6	0,3	$3,3 \times 10^{-6}$
44-690/20	1,9	97,9	---	0,2	$6,2 \times 10^{-6}$

Tabelle 17: Verteilung der Rekombinanten der Kreuzungen auxotropher Mutanten von 44-690 mit 1-590.

x) ly Rekombinanten gibt es nur dort, wo die Donoren ly Segreganten bilden (s. Tab. 15)

Donor	Anteil der Rekombinanten in %				Rek.-rate Verd. II
	y	1	ly ^x	sekt	
44-690/1	61,5	24,8	12,3	1,4	$1,7 \times 10^{-6}$
44-690/3	51,4	48,6	0,0	0,0	$9,3 \times 10^{-8}$
44-690/4	93,3	5,4	---	1,3	$2,4 \times 10^{-6}$
44-690/10	77,7	22,3	---	0,0	$1,7 \times 10^{-7}$
44-690/11	82,9	17,1	---	0,0	$6,7 \times 10^{-8}$
44-690/12	50,2	43,0	4,7	2,1	$7,0 \times 10^{-7}$
44-690/20	55,0	37,3	---	7,7	$1,1 \times 10^{-6}$

Tabelle 18: Verteilung der Rekombinanten der Kreuzungen auxotropher Mutanten von 44-690 mit 1-593.

x) s. Tabelle 17

weiß, 44-690/1, 12 weiß und hellgelb.

Die meisten gelben, diploiden Rekombinantenkolonien entsprachen mit ihrer glatten und hochgewölbten Koloniemorphologie den Donoren; nur einige bildeten rauhe, flache Kolonien oder etwas abweichende Gelbtöne.

2.4.4.3. Zusammenfassendes Ergebnis der Kreuzungen

Bei fast allen Kreuzungen entstand ein hoher Anteil gelber, diploider Rekombinanten. Der gekoppelte Transfer von Exo- und Endogenot vom Donor auf die Rezipienten bestätigt auch für den merodiploiden Stamm 44-690 die Insertionshypothese.

2.4.5. Kreuzungen der Elternstämme 1-44 und 1-690 mit den Rezipienten 1-590 und 1-593

An den Kreuzungen auxotropher Mutanten von 44-690 mit den Rezipienten waren auch bis zu 20 % weiße Segreganten beteiligt (s. Tab. 16), die ihrerseits mit den Rezipienten weiße Rekombinanten bilden konnten. Da bekannt ist, daß bei der Kreuzung 2er weißer Stämme neben haploiden, weißen auch diploide Kolonien entstehen (z.B. 1-44 x 1-690), die gelb gefärbt sind, könnte argumentiert werden, daß die gelben Rekombinanten aus 44-690/1 - 20 x 1-590, 1-593 nicht nur durch Transfer der diploiden Region, sondern teilweise oder vollständig durch Neubildung der Diploidie aus einem von den Segreganten auf 1-590 oder 1-593 übertragenen Exogenoten entstanden sind.

Zur Klärung dieses Problems wurden stellvertretend für die Segreganten die Elternstämme von 44-690 mit den beiden Rezipienten gekreuzt und der Anteil gelber, diploider Kolonien an der Gesamtzahl der Rekombinanten ermittelt.

Folgende Kreuzungen wurden durchgeführt (Tabelle 19):

1-690 x 1-590

1-690 x 1-593

1-44 x 1-593

Auf die Kreuzung 1-44 x 1-590 konnte wegen gleicher Auxotrophie-markierung verzichtet werden.

Kreuzung	Rekombinanten		Rek.-rate Verd. II
	% 1	% y	
1-690 x 1-590	99,5	0,5	$4,0 \times 10^{-6}$
1-690 x 1-593	98,2	1,8	$6,0 \times 10^{-7}$
1-44 x 1-593	97,1	2,9	$2,4 \times 10^{-7}$

Tabelle 19: Rekombinantenverteilung und Rekombinationsraten der Kreuzungen 1-690, 1-44 x 1-590, 1-593.

Der Anteil gelber Kolonien blieb deutlich unter den Werten, die bei den Kreuzungen der diploiden Stämme 44-690/1 - 20 mit 1-590 und 1-593 erreicht wurden.

V. Diskussion

1. Allgemeines

Bei der Kreuzung zweier Stämme von Rhizobium lupini entstehen neben haploiden Rekombinanten mit den Farben der Elternstämme einige merodiploide Kolonien, die aufgrund des Karotinoidsystems an ihrer additiven Pigmentierung leicht zu erkennen sind. Auf Vollmedium bilden merodiploide Kolonien haploide Segreganten, die wieder die Markierungen (Pigmentierung, Auxotrophie) der Elternstämme in beliebiger Kombination aufweisen (11). Merodiploide Zellen verdanken ihre neue Pigmentierung und ihre Prototrophie der Komplementation elterlicher Eigenschaften, enthalten also neben dem Chromosom des Rezipienten (Endogenot), aus dem sie hervorgegangen sind, auch den vom Donor während der Konjugation übertragenen Exogenoten. Dieser muß in der Zygote so stabilisiert werden, damit er zusammen mit dem Chromosom über viele Generationen auf die Nachkommen weitergegeben werden kann. Die Manifestierung könnte auf zweierlei Weise verwirklicht werden:

- a) Der Exogenot zirkularisiert und bildet ein eigenes Replikon in der merodiploiden Zelle.
- b) Der Exogenot wird in das Rezipientenchromosom integriert, mit diesem zusammen repliziert und auf die Tochterzellen weitergegeben.

Untersuchungen der Segregationsmuster diploider Stämme und "Curing"-Experimente mit Acridinorange brachten keine eindeutige Entscheidung für die eine oder andere Hypo-

these (27). Um eine Existenz des Exogenoten als extra-chromosomales Element nachweisen zu können, wurden molekularbiologische Experimente durchgeführt, die üblicherweise für den Nachweis und die Isolierung von Plasmiden angewandt werden, so die CsCl-EtBr-Dichtegradientenzentrifugation und die DNA-Analyse aus Minizellen diploider Stämme. Der DNA-Transfer merodiploider Donoren auf verschiedene Rezipienten wurde zum Nachweis der Integration des Exogenoten untersucht.

2. Molekularbiologische Experimente

2.1. DNA-Dichtebestimmungen

DNA-Dichtebestimmungen wurden nur für den diploiden Stamm 171-716 und seine Elternstämme 1-171 und 1-716 durchgeführt, da 1-171 wegen seiner von den übrigen R. lupini Stämmen abweichenden Herkunft möglicherweise eine andere DNA-Dichte hätte besitzen können. Baron (6) und Wohlhüter (34) konnten nämlich bei Proteus mirabilis Hybriden, die Teile eines E. coli Chromosoms enthielten, aufgrund der unterschiedlichen DNA-Dichten von Proteus (1,698 g/ml) und von E. coli (1,710 g/ml) im CsCl-Gradienten Endo- und Exogenoten-DNA in zwei getrennten Banden darstellen. Die Größe der E. coli Bande und die genetisch ermittelte Länge des Exogenoten standen dabei in einem unmittelbaren Zusammenhang. Die in der analytischen Ultrazentrifuge im CsCl-Gradienten ermittelten DNA-Dichten

von 1-171 und 1-716 stimmten jedoch überein, so daß auch für den merodiploiden Stamm 171-716 nur eine DNA-Bande mit der Dichte 1,7248 g/ml nachweisbar war.

2.2. CsCl-EtBr-Dichtegradientenzentrifugation der DNA haploider und diploider Stämme

Wenn der Exogenot in der merodiploiden Zelle plasmidähnlich stabilisiert wird, mußte es möglich sein, seine DNA aufgrund ihrer physikalischen Form als ccc-DNA von der Endogenoten-DNA, die während der Lysatgewinnung ihre zirkuläre Struktur verliert und in lineare Stücke zerfällt, im CsCl-EtBr-Dichtegradienten trennen zu können.

Bei gleicher Dichte und unterschiedlicher physikalischer Form von Exo- und Endogenoten-DNA dient die Zugabe von Äthidumbromid einer besseren Trennung, da es durch die stärkere Einlagerung in lineare DNA deren Dichte stärker herabsetzt, so daß die Endogenoten-DNA als obere Bande, die ccc-DNA des Exogenoten als darunterliegende, dichtere Bande im CsCl-EtBr-Gradienten zu finden sein müßte. Alle untersuchten haploiden und diploiden Stämme bildeten jedoch nur eine chromosomale Bande aus, bei einem Kontrollstamm mit dem RP4-Plasmid zeigte sich jedoch auch eine deutliche Plasmidbande. Obwohl dieses Ergebnis zunächst eine extrachromosomale, plasmidartige Existenz des Exogenoten ausschließt, muß daraufhingewiesen werden, daß im CsCl-Gradienten nur Plasmide bis etwa 100µm noch als

intakte, zirkuläre Moleküle nachweisbar sind. Die o.a. Experimente schließen daher nicht aus, daß der Exogenot ein großes Plasmid bildet, das jedoch während der Lyse der Zellen und Isolierung der DNA in lineare Stücke zerfällt und so in der chromosomalen Bande verschwindet. Die Länge der c-Region von R. lupini ist zwar nicht bekannt, doch kann man vermuten, daß der Exogenot, der aus einem nicht unbedeutenden Teil der c-Region des Donors besteht, eine Größe hat, die jene von noch intakt isolierbaren Plasmiden übertrifft.

2.3. Untersuchungen an Minizellen diploider Stämme

Eine weitere Methode zum Nachweis und zur Anreicherung extrachromosomaler DNA ist ihre Segregation in Minizellen (16, 17). Tucher konnte bei R. lupini das RP4-Plasmid aufgrund seiner Segregation in Minizellen isolieren (32). Es war durchaus denkbar, daß eine merodiploide, minizellenproduzierende Mutante in der Lage sein könnte, einen extrachromosomalen Exogenoten in die von ihr abgeschnürten Minizellen zu segregieren. Außerdem konnte angenommen werden, daß die Größe des Exogenoten dabei keine so limitierende Rolle spielen würde. Bei der Isolierung der DNA aus den Minizellen würde es zwar auch zu einer Zerstörung seiner zirkulären Struktur kommen, aber es sollte zunächst auch nur der DNA-Gehalt von Minizellen haploider und diploider Stämme durch eine CsCl-Dichtegradientenzentrifugation in der analytischen Ultrazentrifuge

verglichen werden. Waren die DNA-Banden der Minizellenfraktionen eines diploiden Stammes und des haploiden, elterlichen Rezipientenstammes gleichgroß, so enthielten die Minizellen des diploiden Stammes keine DNA. Die nachweisbaren, kleinen DNA-Banden stammten von auch nach der Reinigung noch in Minizellenfraktionen vorhandenen, teilungsfähigen Zellen. War die DNA-Bande der Minizellenfraktion des diploiden Stammes hingegen wesentlich größer, so war dieser Zuwachs auf das Vorhandensein von Exogenoten-DNA in den Minizellen zurückzuführen. Die Untersuchung der DNA aus Minizellen der Stammpaare 1-536/171-536 und 1-716Mz/171-716Mz brachte keinen Unterschied in den Gipfeln der haploiden und diploiden Minizellenfraktionen, eine Segregation des Exogenoten in Minizellen fand also nicht statt. Ein Kontrollversuch mit 171-536(RP4) zeigte jedoch deutlich, daß das RP4-Plasmid in den Minizellen nachweisbar ist.

Somit konnte mit großer Wahrscheinlichkeit ausgeschlossen werden, daß der Exogenot als Plasmid in der diploiden Zelle vorliegt. Nur noch eine Integration des Exogenoten in das Chromosom oder aber eine extrachromosomale Existenz mit einer nicht-kovalenten Bindung an das Chromosom, die eine Segregation in Minizellen oder getrennte Darstellung im CsCl-EtBr-Dichtegradienten verhinderte, war denkbar.

3. Genetische Experimente

Die genetischen Experimente dienten dem Nachweis einer Integration des Exogenoten in das Chromosom der merodiploiden Zelle durch den gemeinsamen Transfer der beiden homologen Bereiche der c-Region auf einen Rezipienten. Die Kreuzungen auxotropher Mutanten der merodiploiden Stämme 44-716, 171-43 und 44-690 mit verschiedenen Rezipienten ergaben zu einem hohen Anteil diploide Rekombinanten, die hinsichtlich Pigmentierung und Segregationsverhalten überwiegend mit den Donoren übereinstimmten. Derartige Ergebnisse sind nur dann zu erwarten, wenn in den merodiploiden Donorzellen der Exogenot in den Endogenoten integriert ist. Beim Nachweis des Transfers der Diploidie erwies sich das Karotinoidsystem als sehr nützliches und einfaches Indikatorsystem. Anhand der Ergebnisse der Kreuzungen und Segregantenanalysen konnten Vorstellungen über die Merodiploidie bei R. lupini entwickelt werden, wobei vor allem die Mechanismen der Integration und Segregation sowie die Genfolge in der diploiden Region von Interesse waren.

3.1. Entstehung der diploiden Genomstruktur

Die Ergebnisse der Kreuzungsexperimente bewiesen - angezeigt durch den gekoppelten Transfer der beiden Karotinoidregionen - , daß Exo- und Endogenot in unmittelbarer Nachbarschaft zueinander in Tandemstruktur angeordnet sind. Aus den Segregantenanalysen war zu entnehmen, daß Farbe und Prototrophie der diploiden Stämme durch Komplementa-

tion der homologen Bereiche der c-Regionen der beiden Elternstämme verursacht sind und bei der Segregation die elterlichen Eigenschaften meistens in neuer Kombination wieder zu Tage treten. Dies galt jedoch nicht für proximal in der c-Region liegende Markierungen, wie die Thiamin-Markierung, die bei den Segreganten von 44-716, 171-43 und 44-690 nie zu finden war. Dies läßt den Schluß zu, daß es in der Rezipientenzelle nach dem Transfer der Donor-DNA im proximalen Bereich zu normalen Rekombinationsereignissen zwischen Exo- und Endogenoten mit anschließender Haploidisierung kommt, im Bereich der Karotinoidregion und der benachbarten distalen Gene jedoch durch Insertion des Exogenoten zur Diploidie. Eine ähnliche Beschränkung der Diploidie findet man bei Bacillus subtilis (3), wo der Bereich um den Ort des Replikationsbeginns durch Transformation nie in einen diploiden Zustand überführt werden kann.

Integrationsmechanismen

Im Folgenden werden einige Modellvorstellungen für die Integration des Exogenoten vorgestellt und am Beispiel des Stammes 44-716 erläutert.

Modell 1

Die Integration erfolgt durch Paarung homologer Bereiche von Exo- und Endogenoten und einfaches Crossing-over, ähnlich dem Campbell-Mechanismus. Da Exo- und Endogenot

über ihre ganze Länge homolog sind, kann die Integration an jeder beliebigen Stelle stattfinden. Ob und wie es vorher zu einer Zirkularisierung des Exogenoten kommt, ist unbekannt. Die Abbildung 9 zeigt die beiden Möglichkeiten der Integration für zwei beliebige Markierungen Y und Z mit und ohne Zirkularisierung, wobei sich in jedem Fall die beiden freien Enden des Exogenoten (= 1, 2) finden müssen. Eine solche Fusion 2er heterologer Enden wird u.a. von Stodolsky (28) bei der Genduplikation des pro-lac-Genorts bei E. coli postuliert, wobei der Mechanismus unbekannt ist. Da jedoch Doppelstrangbrüche im Chromosom stets letal sein sollen, wäre die Zirkularisierung des Exogenoten vor der Integration vorzuziehen.

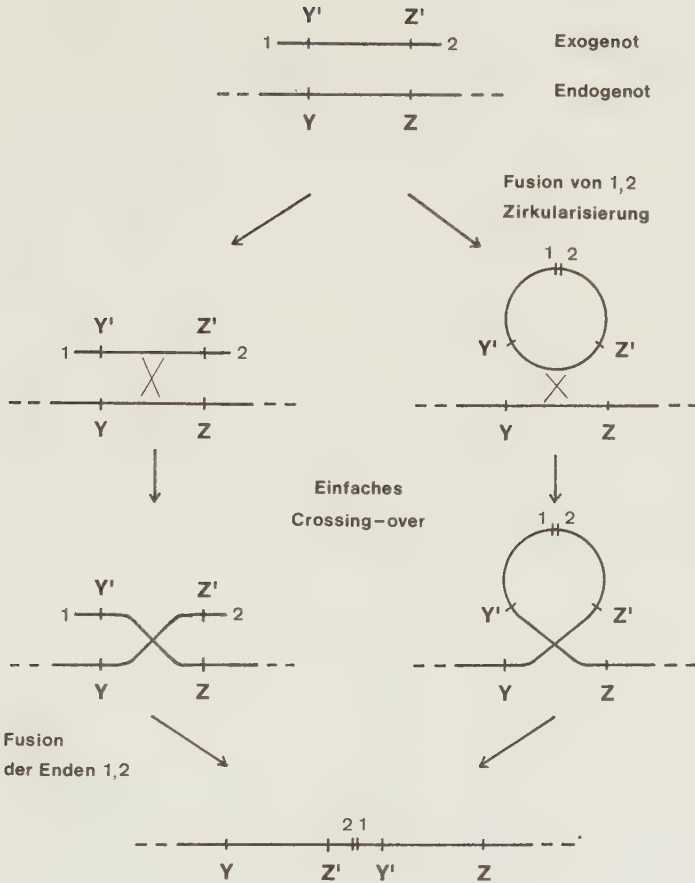


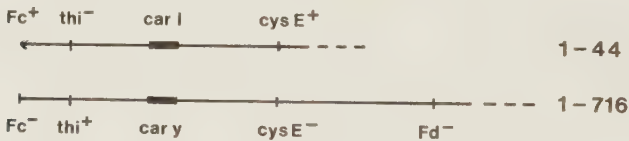
Abbildung 9: Allgemeines Integrationsmodell für einen Exogenoten linearer Form (links) oder nach Zirkularisierung (rechts).

Diese Integration kann auch in den Regionen rechts von Z und links von Y stattfinden, wobei sich die Reihenfolge der Markierungen Y, Z, Y' und Z' ändert, nicht jedoch die der Genorte in den beiden, die Diploidie bildenden Regionen (s. Abb. 10).

Die Entstehung der Merodiploidie bei 44-716 ist in der Abbildung 10 dargestellt.

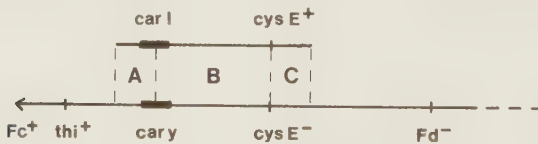
Abbildung 10:

a) Genkarten der beteiligten Stämme:



b) Ausbildung der diploiden Struktur

1. Schritt: Haploidisierung des proximalen Bereichs der c-Region mit Einrekombination der Fc^+ -Eigenschaft des Donors in das Rezipientenchromosom (9)

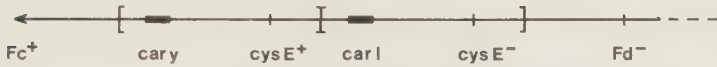


2. Schritt: Integration des Exogenots durch einfaches Crossing-over. Bei 2 Markierungsorten ($car - cys\ E$) gibt es 3 homologe Integrationsbereiche (= A, B, C), die jeweils zu einer anderen Reihenfolge der 4 Markierungen $car\ I - car\ y - cys\ E^- - cys\ E^+$ führen.

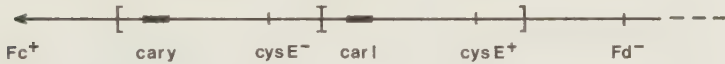
Typ A: Integration im Bereich A



Typ B: Integration im Bereich B



Typ C: Integration im Bereich C



Typ D: Entsteht als seltene Möglichkeit durch Integration im Bereich A und zusätzliches Doppelcrossing-over in B und C.



Modell 2

Stodolsky (28) nimmt für die Integration eines DNA-Fragments in die homologe Chromosomenregion eine durch zwei Crossing-over gebildete Intermediärstruktur an, bei deren Replikation es zu Brüchen der Replikationsgabeln kommt und die entstandenen freien Enden schließlich fusionieren. Für 44-716 ist dieses Modell in der Abbildung 11 dargestellt.

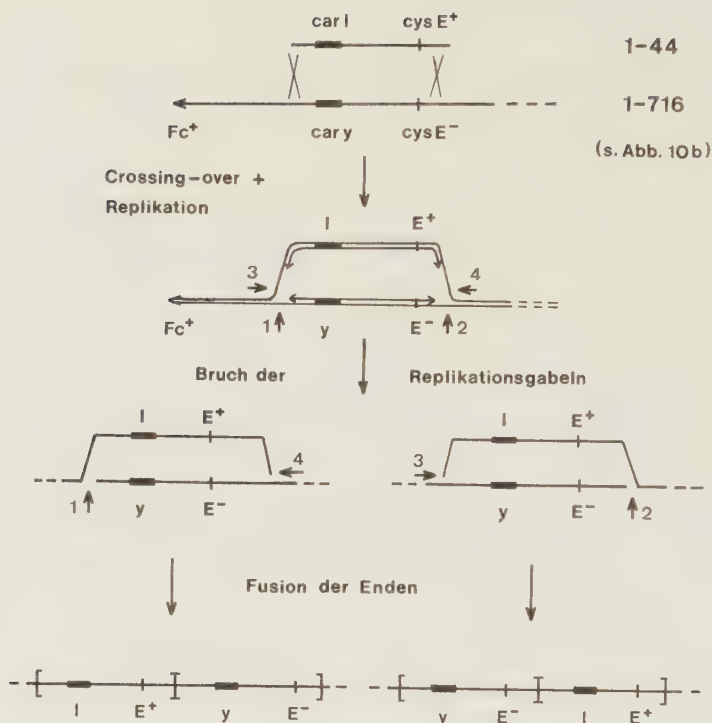


Abbildung 11: Integration eines Exogenoten durch zweifaches Crossing-over, Bruch der Replikationsgabeln und Fusion der freien Enden.

$E^+ = cys E^+$

$1 = car 1$

$E^- = cys E^-$

$y = car y$

Nur alternative Brüche (1/4 und 2/3) führen zu diploiden Strukturen, wobei jedoch nur die beiden Integrations-typen A und C aus Abbildung 10 entstehen können.

Modell 3

Eine weitere Theorie zur Entstehung merodiploider Transkonjuganten wäre die Existenz einiger Rezipientenzellen in der haploiden Population, die bereits eine phänotypisch nicht erkennbare Tandemduplikation in ihren Chromosomen besitzen. Durch einfache Rekombination wird der von Donor übertragene Exogenot gegen eine der beiden Kopien der verdoppelten Region des Rezipienten ausgetauscht, so daß eine heterogenote, d.h. phänotypisch erkennbare Merodiploidie entsteht. Dieser Mechanismus wurde von Anderson für die Entstehung von Tandemduplikationen des Histidin-Operons nach Allgemeiner Transduktion bei Salmonella typhimurium postuliert (1). Die dazu notwendigen, homogenot diploiden Rezipienten können spontan entstanden sein. Sowohl Hill (14) und Strauß (29) konnten bei E. coli zeigen, daß UV-Bestrahlung und chemische Mutagenie die Spontanrate zur Bildung genetischer Duplikationen erhöhen. Für die Entstehung solcher Duplikationen werden u.a. ungleiche Rekombinationen zwischen den zwei Ästen des sich replizierenden Chromosoms angenommen. Eine bis zu ein Drittel des Genoms umfassende, spontane Duplikation bei Salmonella wurde von Straus (30) beschrieben.

Übertragen auf den Stamm 44-716 würde dies bedeuten: Unter den Individuen des Rezipienten 1-716 gibt es einige spontan entstandene, nur für einen beschränkten Bereich der c-Region homogenot diploide Zellen mit folgender Struktur:



Abbildung 12: Struktur einer diploiden Variante von 1-716

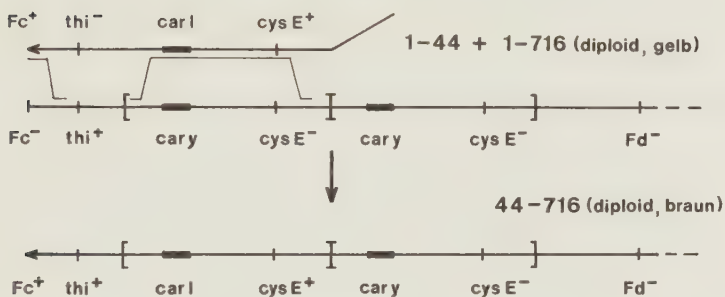
Eine solche Zelle ist phänotypisch nicht von einer haploiden zu unterscheiden, beide sind gelb und auxotroph für den Cys E-Ort. Nach der Übertragung der Donor-DNA von 1-44 und deren Einrekombination in eine der beiden Regionen (I oder II) entsteht eine, durch Komplementation braune und prototrophe, diploide Zygote, aus der sich auf den MM+NB-Kreuzungsplatten eine Kolonie entwickeln kann. Je nachdem, mit welcher der beiden diploiden Regionen sich der Exogenot paart, erhält man wiederum verschiedene Reihenfolgen der 4 Markierungen car 1, car y, cys E⁻ und cys E⁺ in der Tandemstruktur.

1. Exogenot paart mit Region I (Abbildung 13)

Das Ergebnis ist die Reihenfolge car 1 - cys E⁺ - car y - cys E⁻, sie entspricht dem Integrationstyp A aus Abbildung 10 Seite 71.

2. Der Exogenot paart mit Region II, daraus entsteht nach einem 2-fachen Crossing-over die Reihenfolge car y - cys E⁻ - car 1 - cys E⁺, die dem Integrationstyp C entspricht.

3. Auch der Integrationstyp D mit der Reihenfolge
 $\text{car } l - \text{cys } E^- - \text{car } y - \text{cys } E^+$ kann gebildet werden,
wenn es zu einer gleichzeitigen Paarung des Exogeno-
ten mit den äußeren Bereichen der Regionen I und II
und zu einem 4-fachen Crossing-over kommt.
4. Der Integrationstyp B kann nicht entstehen.



Abbildungung 13: Darstellung einer der 3 Paarungen des Exogenoten von 1-44 mit dem Genom von 1-716 und des resultierenden Integrationstyps.

Die für 44-716 dargestellten Integrationsmodelle sind auch für die diploiden Stämme 171-43 und 44-690 anwendbar. Es soll hier jedoch nicht näher darauf eingegangen werden.

3.2. Die Aufhebung des diploiden Zustandes

Alle diploiden Stämme segregieren während ihrer Vermehrung wieder haploide Zellen ab. Diese Segreganten tragen die Farben und Markierungen der Elternstämme in allen Kombinationen (11), ausgenommen solche Markierungen, die im nicht diploidisierenden, proximalen Bereich der c-Region liegen. Diese Vielfalt an Segreganten ist nur durch Rekombination zwischen Exo- und Endogenoten vor der Segregation zu erklären. Merodiploide Stämme, die aus derselben Kreuzung hervorgegangen sind, können sich hinsichtlich ihres Segregationsverhaltens unterscheiden. Die Häufigkeit, mit der Segreganten gebildet werden, ist für jeden diploiden Klon unterschiedlich stark ausgeprägt (11), erkennbar an der mehr oder weniger deutlichen Sektorierung der merodiploiden Kolonien. Diese Verschiedenartigkeit kann mit der Länge und dem Integrationsort, sowie der Reihenfolge und den Abständen der Markierungen in der diploiden Region im Zusammenhang stehen. Die Ergebnisse aus der Tabelle 3 (S. 34) und aus der Tabelle 12 (S. 46) für 44-716 bzw. 171-43 zeigen, daß die Anteile der verschiedenen Segregantentypen für einen bestimmten Klon (44-716 a, c, d, f und k bzw. 171-43 a und b) charakteristisch und konstant sind. Die mit einer Haploidisierung einhergehende Segregation ist die Folge der Paarung homologer Bereiche des Exo- und Endogenoten, eines einfachen Crossing-over durch Strangüberkreuzung und Herausrkombination eines Genomsatzes der Diploidie nach dem

Modell von Campbell. Ab und zu scheint es auch nur zum Verlust eines Teils der diploiden Region zu kommen, wodurch aus einem Klon mit konstantem Segregationsmuster Nachkommen entstehen, die ein abweichendes Segregationsverhalten zeigen (11).

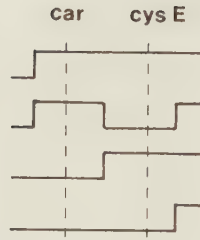
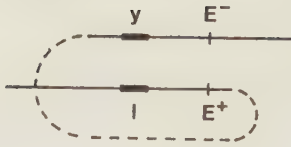
a) Im Folgenden soll auf die Segregantenbildung bei 44-716 genauer eingegangen werden.

In der Abbildung 14 sind auf der linken Seite alle 4 Integrationstypen A - D aus der Abbildung 10 in einer schematisierten Form dargestellt, wobei homologe Bereiche gepaart wurden. Rechts dazu sind die Rekombinationsereignisse aufgezeichnet, die zur Bildung der 4 möglichen Segregantentypen führen. Es ist zu erkennen, daß bei allen Integrationstypen alle diese Segreganten entstehen können. Ein Unterschied besteht nur darin, daß es zu jedem Integrationstyp einen bestimmten Segregantentyp gibt, der nur durch ein dreifaches Crossing-over entstehen kann.

Bei Integrationstyp A: y prt
 B: 1 prt
 C: 1 cys E
 D: y cys E

Dieser Segregant ist daher seltener zu erwarten als die übrigen 3 Segregantentypen, die bereits durch einfaches Crossing-over entstehen. So ist es möglich, für die verschiedenen Klone 44-716 a, c, d, f und k die Anordnung der elterlichen Markierungen zu ermitteln, indem aus den

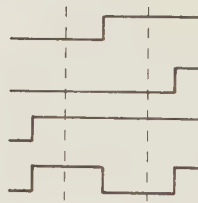
TYP A



Segregant

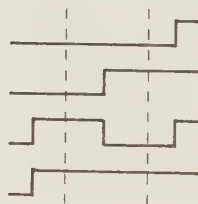
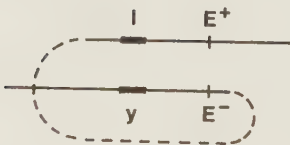
y cys E⁻
y prt
1 cys E⁻
1 prt

TYP B



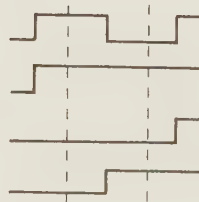
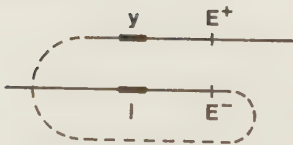
y cys E⁻
y prt
1 cys E⁻
1 prt

TYP C



y cys E⁻
y prt
1 cys E⁻
1 prt

TYP D



y cys E⁻
y prt
1 cys E⁻
1 prt

Abbildung 14: Beziehung zwischen Integrationsstyp und Segregantenbildung bei 44-716
Weitere Erläuterungen im Text

Ergebnissen der Segregantenanalysen (Tab. 3., S. 34) der seltenste Segregantentyp herausgesucht und der dazugehörige Integrationstyp aus der Abbildung 10 (S. 71) bestimmt wird (Tabelle 20)

Stamm	Seltenster Segregant	Integrations- typ
44-716 a	car 1, prt	B
44-716 c	car 1, cys E	C
44-716 d	car 1, cys E	C
44-716 f	car y, prt	A
44-716 k	car 1, prt	B

Tabelle 20: Zusammenhang zwischen Integrationstyp und seltenstem Segreganten bei den Stämmen 44-716 a - k (Vergl. Tab. 3, Seite 34).

Vergleicht man die gefundenen mit den bei den 3 Integrationsmodellen zu erwartenden Integrationstypen, so spricht das Auftreten von Typ B sowohl gegen Modell 2 (Integration durch 2-faches Crossing-over, Bruch der Replikationsgabeln und Fusion) als auch gegen Modell 3 (vorgebildete Diploidie im Rezipienten).

b) 171-43

Je nachdem, in welchem homologen Bereich der Einbau des Exogenoten erfolgte, können auch bei diesem Stamm vier

Integrationstypen entstehen, die ihrerseits wieder ein ihnen charakteristisches Segregationsmuster ergeben. Bei 171-43 a ist der Anteil des Segreganten car y, prt, bei 171-43 b der des Segreganten car p, cys O am seltensten (Tabelle 12, S. 46). Damit würden sich für 171-43 a und b die in Abbildung 15 dargestellten Strukturen ergeben.

171-43 a



171-43 b



Abbildung 15: Reihenfolge elterlicher Markierungen der diploiden Stämme 171-43 a und b.

3.3. Kreuzungsexperimente

Alle Kreuzungen auxotropher Mutanten der diploiden Stämme 44-716, 171-43 und 44-690 mit verschiedenen Rezipienten führten zur Entstehung von prototrophen, diploiden Rekombinanten, die auf Vollmedium mit wenigen Ausnahmen in dieselben Farben wie die diploiden Donoren segregierten. Die Diskussion der Ergebnisse der verschiedenen Kreuzungen wird dadurch erschwert, daß neben den diploiden Zellen des Donors auch dessen haploide Segreganten an den

Kreuzungen beteiligt waren. Die von haploiden Segreganten auf die Rezipienten übertragene DNA führt zur Bildung haploider Rekombinanten (Ausnahme s. V.3.3.4.), die von diploiden Donorzellen übertragene DNA kann sowohl zu diploiden als auch haploiden Rekombinanten führen, je nachdem, ob die ganze oder nur Teile der transferierten diploiden Region in das Rezipientenchromosom integriert werden. Ein Vergleich der Ergebnisse der Kreuzungen verschiedener auxotropher Mutanten mit dem gleichen Rezipienten ist wegen der unterschiedlich starken Segregation nur bedingt möglich. In den folgenden Kapiteln werden deshalb nur solche Probleme behandelt, die für die Entstehung der diploiden Rekombinanten von Bedeutung sind.

3.3.1. Kreuzungen mit 44-716 a1 - k3

a) 44-716 a1 - k3 x 1-590

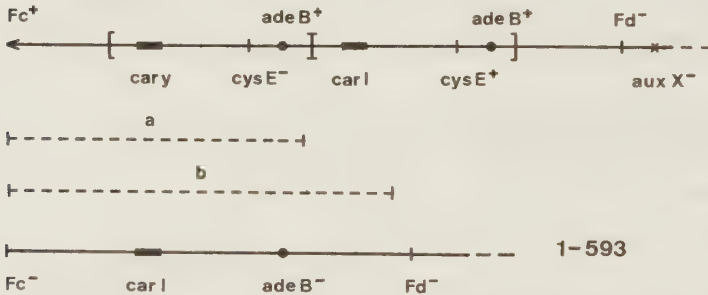
Die Kreuzungen mit f8, f14, f17 und k2 brachten erwartungsgemäß viele weiße Rekombinanten hervor, da die Thiaminmarkierung von 1-590 proximal liegt und alle kurzen, transferierten DNA-Stücke bereits prototrophe, haploide Rekombinanten bilden können. Braune, diploide Rekombinanten entstehen erst, wenn vom Donor zumindest beide Karotinoidregionen auf 1-590 übertragen und einrekombiniert worden sind. Nicht erklärbar sind die hohen Braunanteile bei den Donoren a1, c2, f8 und k3.

b) 44-716 a1 - k3 x 1-593

Mit c2 und k3 entstand ein hoher Anteil diploider Rekombinanten, während bei a1 und f8 dieser Anteil geringer ausfiel. Die Erklärung dafür kann in der verschiedenen langen Ausdehnung der diploiden Region liegen. Die Abbildung 16 soll den theoretisch vorstellbaren Unterschied von einerseits a1/f8 und andererseits c2/k3 deutlich machen. Die Reihenfolge der elterlichen Markierungen ist beliebig gewählt worden.

Abbildung 16a:

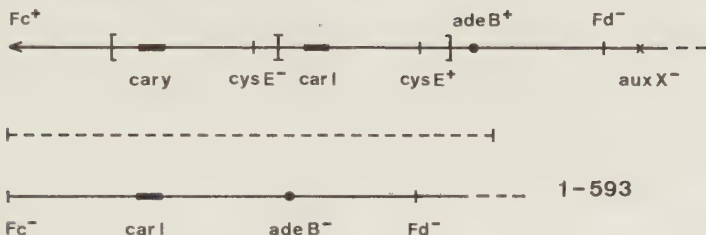
44-716 aux.



Der $Ade B^+$ -Genort liegt noch im diploiden Bereich und ist daher zweimal vertreten. Ein Donorstück mit der Länge a führt nach Übertragung in den Rezipienten 1-593 bereits zu haploiden, gelben oder weißen, prototrophen Rekombinanten; diploide Rekombinanten entstehen erst, wenn ein Donorstück mit der Mindestlänge b übertragen wurde. Es werden also viele haploide und wenige diploide Rekombinanten entstehen.

Abbildung 16b:

44-716 aux.



Die Duplikation ist so kurz, daß $ade B^+$ im distalen, haploiden Bereich liegt. Um prototrophe Rekombinanten zu erhalten, muß $ade B^+$ in die Rezipientenzelle übertragen werden, wobei die ganze diploide Region zwangsläufig auch in den Rezipienten gelangt und dort einrekombiniert werden kann, was zur bevorzugten Entstehung brauner, diploider Rekombinanten führt. Die Struktur aus Abb. 16a müßte für a1 und f8, die aus Abb. 16b für c2 und k3 postuliert werden.

c) 44-716 a1 - k3 x 1-711

Der Anteil der diploiden Rekombinanten ist außer bei f17 sehr hoch. Da die Ade F-Markierung sehr weit distal auf der c-Region liegt, ist die zu Abbildung 16b abgegebene Erklärung auch für 1-711 gültig.

d) 44-716 a1 - k3 x 1-921

Der Braunanteil ist relativ niedrig. Die Ursache dafür ist die Lage der Cys O-Markierung zwischen der Karotinoid-region und dem Cys O-Genort, einem Bereich, der bei den Donoren diploid vorliegt. Der Cys O-Genort ist also in der diploiden Region zweimal vorhanden (Abb. 17).

44-716 aux.

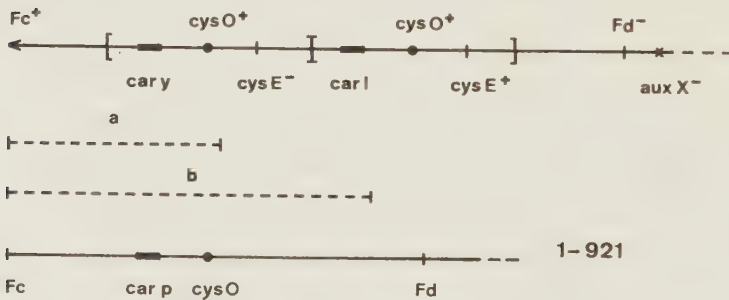


Abbildung 17: Darstellung der Markierungen der an den Kreuzungen 44-716 a1 - k3 x 1-921 beteiligten Stämme.

Es ist deutlich zu erkennen, daß nur Donor-DNA-Stücke mit der Mindestlänge b zur Bildung diploider Rekombinanten führen. Alle DNA-Stücke, die kürzer als b, aber länger als a sind, lassen nur haploide Rekombinanten entstehen. Da kurze DNA-Stücke häufiger als lange übertragen werden, kommt es bei den Kreuzungen zu einer Bevorzugung haploider Rekombinanten.

e) 44-716 a1 - k3 x 1-716

Bei dieser Rückkreuzung bildeten a1 und c2 mehr braune Rekombinanten als k2 und k3. Wenn die Donoren die Genfolge vom Typ C oder D (Abb. 10, S. 71) besitzen, bilden sich nur dann diploide Rekombinanten, wenn beide diploiden Regionen einschließlich des Cys E⁺-Genortes in den Rezipienten übertragen worden sind. Ein hoher Anteil brauner Rekombinanten ist die Folge.

Mit Donoren vom Typ A und B entstehen weniger braune Rekombinanten, da die Übertragung der vorderen Hälfte des diploiden Bereichs bereits haploide Rekombinanten ergibt.

Obwohl die Mutanten f8 - f17 alle aus Klon 44-716 f entstanden sind, sie daher dem gleichen Integrationstyp angehören, ergaben sie unterschiedliche Verteilungen der Rekombinanten mit demselben Rezipienten. Anscheinend spielt die Lage der auxotrophen Markierung eine entscheidende Rolle. Dasselbe ist auch bei den Mutanten k2 und k3 zu beobachten.

3.3.2. Kreuzungen mit 171-43 b4

Die Kreuzungen von 171-43 b4 mit 1-590 und 1-593 ergaben wesentlich weniger braune Rekombinanten als mit 1-711.

Die Ursachen sind bei 1-590 die proximale Thiaminmarkierung, bei 1-593 die Annahme, daß der Ade B⁺-Genort in der diploiden Region von 171-43 b4 zweimal auftritt (s. 44-716 x 1-593, Abb. 16a) und bei 1-711, daß der Ade F-Ort von 171.43 b4 distal außerhalb der diploiden Region liegt (s. Abb. 16b).

3.3.3. Kreuzungen mit 44-690

Bei den Kreuzungen von 44-690/1 - 20 x 1-590 sind wieder aufgrund der proximalen Lage der Thiaminmarkierung von 1-590 viele weiße und wenig diploide, gelbe Rekombinanten entstanden, nur 44-690/4 fällt aus der Reihe. Mit 1-593 liegt der Anteil der gelben, diploiden Rekombinanten stets über 50 %, was vermuten läßt, daß die diploide Region von 44-690 so kurz ist, daß der Ade B-Ort distal im haploiden Bereich liegt (Abb. 16b, S.83). Da die Donoren 44-690/1 - 20 alle nur Mutanten eines Klons von 44-690 sind und auch ihre Segregation zum Zeitpunkt der Kreuzung sehr ähnlich ist (Tab. 16), sind die Unterschiede in der Verteilung der verschiedenen Rekombinanten nur auf die unterschiedlichen Auxotrophie-markierungen zurückzuführen.

3.3.4. Kreuzungen der Eltern diploider Stämme mit verschiedenen Rezipienten

Bei der Untersuchung der Aufspaltung der diploiden Rekombinanten trugen nicht alle Segreganten wieder die Elternfarben des Donors, sondern in wenigen Fällen war eine der elterlichen Farben gegen die Farbe des Rezipienten ausgetauscht worden. Solche Neukombinationen konnten natürlich nur bei Kreuzungen entdeckt werden, wo der Rezipient von den Eltern des diploiden Donors abweichend gefärbt war. Bei den Kreuzungen 44-716 a1 - k3 x 1-921 und 1-711 entstanden diploide Rekombinanten, die gelb und rosa bzw.

gelb und zitronengelb aufspalteten. Jeweils die weiße Karotinoidregion war ausgetauscht worden.

Aus 171-43 b4 x 1-593 gingen hellbraune, weiß und rosa aufspaltende, und dunkelgelbe, weiß und gelb aufspaltende diploide Rekombinanten hervor. Ihre Entstehung konnte entweder auf einem Austausch einer der beiden Karotinoidregionen der auf 1-593 übertragenen, diploiden Region des Donors bei der Einrekombination in das Rezipientenchromosom oder auf einer Neubildung der an der Kreuzung beteiligten Segreganten mit den Rezipienten beruhen. An Stelle der Segreganten wurden daher die Elternstämme 1-171 und 1-43 mit 1-593 gekreuzt. 1-171 x 1-593 ergab tatsächlich hellbraune, weiß und rosa aufspaltende Kolonien; aus 1-43 x 1-593 gingen jedoch keine diploiden Rekombinanten hervor. Neukombinierte, diploide Rekombinanten können wahrscheinlich durch beide o.a. Ereignisse entstehen. Bei den Kreuzungen von 44-690/4, 10, 11 und 20 mit 1-593 konnten solche Neukombinationen nicht entdeckt werden, da sowohl die Eltern und Segreganten (Ausnahme 44-690/1, 3, 12) als auch die Rezipienten 1-590 und 1-593 weiß waren. Kreuzungen der weißen Eltern 1-690 und 1-44 an Stelle der weißen Segreganten mit 1-590 und 1-593 ergaben etwa 0,5 bis 2,9 % gelbe, diploide Rekombinanten (Tabelle 19). Wenn man berücksichtigt, daß nur maximal 20 % weiße Segreganten an den Kreuzungen mit den Rezipienten teilnahmen (Tabelle 16), so sind höchstens 0,1 - 0,5 % der gel-

ben Rekombinanten aus 44-690/1 - 20 x 1-590, 1-593 nicht auf den Transfer der diploiden Region zurückzuführen. Unter den braunen Transkonjuganten von 44-716 a1 - k3 x 1-921 waren drei zu finden, die eine Aufspaltung in Gelb, Weiß und Rosa zeigten. Es muß hier Triploidie entstanden sein, indem der diploide Exogenot (car y - car l) in den Endogenoten (car p) integriert wurde, ein Vorgang analog dem, der bei der Kreuzung zweier haploider Stämme zur Diploidie führt. Weitere Untersuchungen über die Triploidie wurden nicht durchgeführt.

4. Bedeutung von Insertionssequenzen für die Merodiploidie bei *Rhizobium lupini*

Alle bisherigen Theorien zur Entstehung und Eliminierung des merodiploiden Zustandes bei *R. lupini* gingen davon aus, daß Integration und Segregation über die Paarung von Exo- und Endogenot, die über ihre ganze Länge homolog sind, und anschließende Rekombination ablaufen. Eine weitere Möglichkeit wäre jedoch die Beteiligung von Insertionssequenzen. Insertionssequenzen (IS) sollen für die Wanderung bakterieller Resistenzgene zwischen Plasmiden und chromosomaler DNA (26) sowie für die Bildung von Resistenzfaktoren mit einer RTF-Einheit und mehreren Tandemkopien der R-Determinante verantwortlich sein (15, 22). Saedler (24) konnte auf dem Chromosom von *E. coli* 8 Kopien von

IS1 und 5 Kopien von IS2 nachweisen, die möglicherweise bei der Bildung von Hfr-Stämmen als Integrationsorte für das F^+ -Episom, auf dem ebenfalls Insertionssequenzen liegen, dienen. Die Entstehung merodiploider Transkonjuganten bei R. lupini könnte mit Insertionssequenzen erklärt werden. Wenn man annimmt, daß solche Sequenzen über das ganze Chromosom des Rezipienten verteilt sind und auch auf dem vom Donor übertragenen Exogenoten vorhanden sind, so ist eine Integration durch Wechselwirkung der Insertionssequenzen von Exo- und Endogenot möglich. Da durch Kreuzungsexperimente der Transfer der gesamten diploiden Region nachgewiesen werden konnte, muß postuliert werden, daß der Exogenot in unmittelbarer Nähe der entsprechenden, homologen Bereiche des Endogenoten oder zumindest in die c-Region und nicht in die d-Region eingebaut wird. Durch die Zweiteilung des R. lupini Chromosoms in 2 Regionen ist es durchaus denkbar, daß jede Region spezifische Insertionssequenzen besitzt, wodurch der Exogenot, der aus DNA der c-Region besteht, wegen ungleicher Insertionssequenzen nicht in die d-Region integrieren kann. Die Segregation kann dadurch erfolgen, daß der Exogenot über die Insertionssequenzen wieder herausrekombiniert wird. Wegen der verschiedenen Segregantentypen muß aber zuvor ein Genaustausch zwischen den die Diploidie bildenden, homologen Regionen stattgefunden haben.

5. Verbreitung der Diploidie bei Bakterien

Diploidie ist bei Bakterien offenbar weit verbreitet. Bei Bacillus subtilis entstehen nach Transformation oder Transduktion merodiploide Stämme, die in der Tryptophan-region diploid sind (2, 3, 4, 5, 31). Bei Pneumococcus wurden nach Transformation merodiploide Mutanten an den Genorten für Sulfonamidresistenz (18 - 21), Erythromycin- und Streptomycinresistenz (23) gefunden. Nach allgemeiner Transduktion entstanden bei Salmonella typhimurium instabile, merodiploide Transduktanten für das Histidin-Operon (1), bei Escherichia coli für das Lac-Operon (28), die Trp A36-Mutante (12) und die Region mit den Genorten Met B, Arg H, su 159 und Thi (13). In allen Fällen konnte die Merodiploidie durch Segregation nachgewiesen werden. Außerdem wurde gezeigt, daß die transduzierte oder transformierte DNA in das Rezipientenchromosom unter Ausbildung einer Tandemstruktur integriert ist, da die diploide Region durch Transformation oder Transduktion auf Rezipienten übertragen werden konnte (1, 13, 23, 33). Bakterien neigen auch zur Bildung spontaner Duplikationen, die durch UV-Licht und mutagene Agentien (14, 29) noch gefördert werden kann.

Der biologische Sinn der spontan oder durch Genaustausch erworbenen Diploidie ist offensichtlich. Merodiploide Bakterien können auf Einflüsse ihrer Umwelt flexibler

reagieren und sind gegen Mutationen weniger anfällig, da sie im diploiden Bereich für jedes mutierte Gen noch das homologe, intakte Gen besitzen. Bei Wildtyp-Rhizobien (Heumann, pers. Mitteilung) und Azotobacter (25) werden polyploide Chromosomenstrukturen angenommen, was für Bodenbakterien besonders wichtig ist, um sich den ständig wechselnden Lebensbedingungen im Erdboden anpassen zu können. Die Untersuchung merodiploider Rhizobien dient somit dem besseren Verständnis der Struktur des Genoms polyploider Wildtyp-Rhizobien und eventuell auch dem Verständnis der Lokalisation der Gene für die Stickstoff-Fixierung.

VI. L i t e r a t u r

- 1 Anderson, R. P., C. G. Miller, and J. R. Roth:
Tandem Duplications of the Histidin Operon Observed
Following Generalized Transduction in Salmonella
typhimurium.
J. Mol. Biol. 105, 201-218 (1976)
- 2 Audit, C., C. Anagnostopoulos: Production of Stable
and Persistent Unstable Heterogenotes in a Mutant
of Bacillus subtilis.
Spores V (L. L. Campbell, ed.) 117-125. Washington:
American Society for Microbiology 1972
- 3 Audit, C., C. Anagnostopoulos: Extent of Diploidy in
Stable and Unstable Merozygotes from Bacillus sub-
tilis Strains Bearing the trp E26 Marker.
Bacterial Transformation (L. J. Archer, ed.) 293-
-305. London and New York: Academic Press 1973
- 4 Audit, C., C. Anagnostopoulos: Genetic Studies Rela-
ting to the Production of Transformed Clones
Diploid in the Tryptophan Region of the Bacillus
subtilis Genome.
J. Bact. 114, 18-27 (1973)
- 5 Audit, C., C. Anagnostopoulos: Studies on the Size
of the Diploid Region in Bacillus subtilis Mero-
zygotes from Strains Carrying the trp E26 Mutation
Mol. Gen. Genet. 137, 337-351 (1975)
- 6 Baron, L. S., P. Gemski, JR., E. M. Johnson and J. A.
Wohlhieter: Intergeneric Bacterial Matings
Bact. Reviews 32, 362-369 (1968)

- 7 Frazer, A. C., Roy Curtiss III: Production, Properties and Utility of Bacterial Minicells.
Current Topics in Microbiology and Immunology 69
- 8 Heumann, W.: Conjugation in starforming Rhizobium lupini.
Mol. Gen. Genet. 102, 132-144 (1968)
- 9 Heumann, W., A. Pühler, and E. Wagner: The two transfer regions of the Rhizobium lupini conjugation. I. Fertility factor elimination and one way transfer.
Mol. Gen. Genet. 113, 308-315 (1971)
- 10 Heumann, W., A. Pühler, and E. Wagner: The two transfer regions of the Rhizobium lupini conjugation. II. Genetic characterization of the transferred chromosomal segments.
Mol. Gen. Genet. 126, 267-274 (1973)
- 11 Heumann, W., R. Springer: Merodiploidy in Rhizobium lupini.
Mol. Gen. Genet. 150, 73-79 (1977)
- 12 Hill, C. W., J. Foulds, L. Soll, and P. Berg: Instability of a Missense Suppressor Resulting from a Duplication of Genetic Material.
J. Mol. Biol. 39, 563-581 (1969)
- 13 Hill, C. W., D. Schiffer, P. Berg: Transduction of Merodiploidy: Induced Duplication of Recipient Genes
J. Bact. 99, 274-278 (1969)
- 14 Hill, C. W., G. Combriato: Genetic Duplications Induced at Very High Frequency by Ultraviolet Irradiation in Escherichia coli.
Mol. Gen. Genet. 127, 197-214 (1973)

- 15 Hu, S., E. Ohtsubo, N. Davidson, and H. Saedler:
Electron Microscope Heteroduplex Studies of
Sequence Relations Among Bacterial Plasmids:
Identification and Mapping of the Insertion
Sequences IS1 and IS2 in F and R Plasmids.
J. Bact. 122, 764-775 (1975)
- 16 Inselburg, J.: Segregation into and Replication of
Plasmid Deoxyribonucleic Acid in Chromosomeless
Segregants of Escherichia coli.
J. Bact. 102, 642-647 (1970)
- 17 Inselburg, J.: R Factor Deoxyribonucleic Acid in
Chromosomeless Progeny of Escherichia coli.
J. Bact. 105, 620-628 (1971)
- 18 Kashmiri, S. V. S., R. D. Hotchkiss: A Study of
Pneumococcal Merodiploids at the Molecular Level.
Genetics 81, 9-19 (1975)
- 19 Kashmiri, S. V. S., R. D. Hotchkiss: Evidence of
Tandem Duplication of Genes in a Merodiploid Region
of Pneumococcal Mutants Resistant to Sulfonamide.
Genetics 81, 21-31 (1975)
- 20 Ledbetter, M. L. S., R. D. Hotchkiss: Chromosomal
Basis of the Merozygosity in a Partially Diploid
Mutant of Pneumococcus.
Genetics 80, 667-678 (1975)
- 21 Ledbetter, M. L. S., R. D. Hotchkiss: Recombination
as a Requirement for Segregation of a Partially
Diploid Mutant of Pneumococcus.
Genetics 80, 679-694 (1975)
- 22 Ptashne, K., S. N. Cohen: Occurrence of Insertion
Sequence (IS) Regions on Plasmid Deoxyribonucleic
Acid as Direct and Inverted Nucleotide Sequence
Duplications.
J. Bact. 122, 776-781 (1975)

- 23 Ravin, A. W., E. A. Takahashi: Merodiploid Ribosomal Loci Arising by Transformation and Mutation in Pneumococcus.
J. Bact. 101, 38-52 (1970)
- 24 Saedler, H., B. Hei: Multiple Copies of the Insertion-DNA-Sequences IS1 and IS2 in the Chromosome of Escherichia coli K-12.
Mol. Gen. . Genet. 122, 267-277 (1973)
- 25 Sadoff, H. L.: Encystment and Germination in Azotobacter vinelandii.
Bacteriological Reviews 39, 516-539 (1975)
- 26 Saunders, S. R.: Transposable resistance genes.
Nature 258, 384 (1975)
- 27 Springer, R.: Genetische Untersuchung der Merodiploidie von Rhizobium lupini.
Diplomarbeit Universität Erlangen 1974
- 28 Stodolsky, M.: Recipient Gene Duplication During Generalized Transduction.
Genetics 78, 809-822 (1974)
- 29 Straus, D. S.: Induction by Mutagens of Tandem Gene Duplications in the glyS Region of the Escherichia coli Chromosome.
Genetics 78, 823-830 (1974)
- 30 Straus, D. S., G. R. Hoffmann: Selection for a Large Genetic Duplication in Salmonella typhimurium.
Genetics 80, 227-237 (1975)
- 31 Trowsdale, J., C. Anagnostopoulos: Evidence for the Translocation of a Chromosome Segment in Bacillus subtilis Strains Carrying the trp E26 Mutation
J. Bact. 122, 886-898 (1975)

- 32 Tucher R.: Untersuchungen an RP4-DNA in Minizellen
von Rhizobium lupini
Dissertation Universität Erlangen 1974
- 33 Vierny, C. J., C. Anagnostopoulos: Induction and Trans-
mission of a Merodiploid Condition Near the Terminal
Area of the Chromosome of Bacillus subtilis.
Genetics 81, 437-458 (1975)
- 34 Wohlhieter, J. A., P. Gemski, Jr., and L. S. Baron:
Extensive Segments of the Escherichia coli K-12
Chromosome in Proteus mirabilis Diploids.
Mol. Gen. Genet. 139, 93-101 (1975)

Herrn Prof. Dr. W. Heumann danke ich für die Überlassung des Themas, seine Betreuung und Unterstützung, sowie sein Interesse am Fortgang der Arbeit. Besonderer Dank gilt Herrn Dr. F. Schöffl für die Einweisung an der analytischen Ultrazentrifuge. Allen Mitgliedern des Instituts danke ich für nützliche Anregungen und Diskussionsbeiträge.

Lebenslauf

Name: Reiner Springer

Geburtstag: 1. 9. 1948

Geburtsort: Fürth/Bay.

Eltern: Heinrich Springer, Bauingenieur grd. und
Emma Springer, geb. Staude

Schulen: September 1955 - Juli 1959 Volksschule
in Fürth
September 1959 - Juli 1968 Mathematisch-
naturwissenschaftliches Hardenberg-Gymna-
sium in Fürth
23. Juli 1968 Reifezeugnis des Hardenberg-
Gymnasiums in Fürth

Studium: November 1968 - August 1974 Studium der
Biologie an der Friedrich-Alexander-Universi-
tät Erlangen-Nürnberg
13. 7. 1971 Diplom-Biologen-Vorprüfung
8. 8. 1974 Diplom-Biologen-Hauptprüfung
Diplomarbeit: Genetische Untersuchung der
Merodiploidie von *Rhizobium lupini*
Seit Oktober 1974 Anfertigung der Dissertation
am Institut für Mikrobiologie der Universität
Erlangen-Nürnberg.

Offsetdruck-Fotodruck

J. Hogl, 8520 Erlangen, Hauptstr. 109 (Nähe Martin-Luther-Platz) Tel. 22990